

**Un análisis genético cuantitativo
del tiempo de floración
en *Arabidopsis***



Universidad Autónoma de Madrid

Eduardo Sánchez Bermejo, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología



**UN ANÁLISIS GENÉTICO CUANTITATIVO
DEL TIEMPO DE FLORACIÓN EN
ARABIDOPSIS**

Eduardo Sánchez Bermejo
Ldo. en Biología

Carlos Alonso Blanco
Científico titular del CSIC
codirector de la Tesis

José Miguel Martínez Zapater
Profesor de Investigación del CSIC
codirector de la Tesis

Madrid, 2008

D. CARLOS ALONSO BLANCO, Científico titular del CSIC, y
D. JOSÉ MIGUEL MARTÍNEZ ZAPATER, Profesor de investigación del CSIC,
codirectores del trabajo de investigación de D. EDUARDO SÁNCHEZ BERMEJO
titulado: “**Un análisis genético cuantitativo de la floración en Arabidopsis**”,
autorizan su presentación para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en
Madrid a 24 de julio del dos mil ocho.

Fdo. José Miguel Martínez Zapater

Fdo. Carlos Alonso Blanco

ÍNDICE GENERAL

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN	
1. Variación genética natural en <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	7
2. Control genético y molecular del tiempo de floración en arabidopsis.....	9
2.1 Ruta dependiente del fotoperiodo.....	10
2.2 Ruta de la vernalización.....	12
2.3 Ruta de autónoma.....	13
3. Análisis genético y molecular de la variación natural en arabidopsis.....	14
3.1 Identificación y caracterización de QTLs.....	15
3.2 Identificación de genes y polimorfismos moleculares responsables de variación natural.....	16
4. Bases genéticas y moleculares de la variación genética natural para el tiempo de floración en arabidopsis.....	17
4.1 Bases genéticas de la variación natural.....	17
4.2 Identificación de genes y alelos responsables de la variación natural.....	18
5. Bases moleculares de la variación natural para el tiempo de floración en especies cultivadas.....	22
6. Antecedentes del presente trabajo.....	25
II.OBJETIVOS.....	26
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Material vegetal.....	29
1.1 Población de RILs Ler/LI-0.....	29
1.2 Líneas de introgresión <i>FAQ3</i>	29
1.3 Líneas de introgresión <i>FAQ2</i>	29
2. Condiciones de cultivo de las plantas.....	30
2.1 Fotoperiodo.....	31
2.2 Vernalización.....	32
2.3 Calidad de la luz.....	32
3. Análisis fenotípicos.....	33
3.1 Cuantificación del tiempo de floración.....	33
3.2 Medida de la longitud del hipocótilo.....	33
4. Análisis genotípicos.....	33

4.1 Extracción de DNA.....	33
4.2 Desarrollo y análisis de marcadores moleculares.....	34
5. Análisis estadísticos y genéticos.....	42
5.1 Análisis estadísticos.....	42
5.2 Construcción del mapa genético Ler/LI-0.....	42
5.3 Análisis de QTLs.....	42
IV. RESULTADOS.....	44
1. Disección genética de la variación para el tiempo de floración en respuesta a la vernalización en la población de RILs Ler/LI-0.....	45
1.1 Análisis de la floración de Ler y LI-0 en respuesta a la vernalización.....	45
1.2 Construcción de una población de líneas recombinantes consanguíneas Ler/LI0.....	46
1.3 Construcción del mapa de ligamiento de la población de RILs Ler/LI-0.....	47
1.4 Análisis del tiempo de floración en la población de RILs Ler/LI-0.....	51
1.5 Análisis de QTLs en la población de RILs Ler/LI-0.....	51
2. Caracterización genética del locus <i>FAQ3</i>, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos.....	61
2.1 Obtención de líneas de introgresión de <i>FAQ3</i>	61
2.2 Caracterización de <i>FAQ3</i>	61
2.2.1 Efecto del alelo <i>FAQ3-Shak</i>	61
2.2.2 Relaciones de dominancia entre los alelos de <i>FAQ3</i>	62
2.3 Mapeo fino de <i>FAQ3</i>	64
2.3.1 Diseño experimental: obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión.....	64
2.3.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión.....	66
3. Caracterización genética del locus <i>FAQ2</i>, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos.....	68
3.1 Obtención de líneas de introgresión de <i>FAQ2</i>	68
3.2 Caracterización de <i>FAQ2</i>	68
3.2.1 Efecto de los alelos <i>FAQ2</i>	68
3.2.2 Relaciones de dominancia entre los alelos de <i>FAQ2</i>	69
3.3 Mapeo fino de los distintos alelos <i>FAQ2</i>	71
3.3.1 Obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión.....	71
3.3.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión.....	73
3.3.2.1 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-C24</i>	73
3.3.2.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-Ri-0</i>	74

3.3.2.3 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-ShaK</i>	76
3.3.2.4 Análisis comparativo de la posición de los loci <i>FAQ2</i> y sus genes responsables.....	77
3.4 Caracterización genética de los loci <i>FAQ2-C24</i>	78
3.4.1 Análisis del efecto de los loci <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i>	78
3.4.2 Relaciones de dominancia de los loci <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i>	80
3.4.3 Reconstrucción del fenotipo temprano <i>FAQ2-C24</i> a partir de líneas <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i>	81
3.5 Análisis de los fotorreceptores <i>CRY2</i> y <i>PHYA</i> como candidatos a <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i>	83
3.5.1 Efecto de los loci <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i> sobre las respuestas a la luz.....	83
3.5.2 Análisis molecular del gen <i>CRY2</i> en las accesiones parentales.....	86
V. DISCUSIÓN	87
1. Bases genéticas de la variación natural para la respuesta a la vernalización ..	88
1.1 Desarrollo de una nueva población de RILs para el estudio de la vernalización..	88
2. Mapeo de QTLs para el tiempo de floración en el cruzamiento <i>Ler</i> x <i>LI-0</i>	88
2.1 QTLs para el inicio de la floración en ambiente sin vernalización.....	89
2.2 QTLs para el inicio de la floración detectados después de la vernalización.....	91
3. Mecanismos moleculares y genes implicados en la variación natural para la respuesta a la vernalización entre <i>Ler</i> y <i>LI-0</i>	92
4. Mecanismos moleculares de la variación de la respuesta a la vernalización en <i>arabidopsis</i>	95
5. Disección genética de los loci de floración de efecto menor <i>FAQ3</i> y <i>FAQ2</i>	96
5.1 Mapeo fino de los loci <i>FAQ</i>	96
5.2 Caracterización genética de los loci <i>FAQ</i>	97
5.3 Colocalización de <i>FAQ3</i> y <i>FAQ2</i> con otros loci y genes.....	98
6. Niveles de complejidad en la disección genética de la variación natural para el tiempo de floración	101
7. Relevancia ecológica de la variación genética natural para el tiempo de la floración	102
VI. CONCLUSIONES	104
VII. BIBLIOGRAFÍA	106

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AGI	Arabidopsis Genome Initiative
AFLP	polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism)
CAPS	polimorfismo de restricción de secuencia amplificada (cleaved amplified polymorphism sequence)
c-DNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CTP	codón de terminación prematuro
cM	centiMorgan
DC	día corto
DE	desviación estándar
DL	día largo
DNA	ácido desoxirribonucleico
d-NTP	deoxi nucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético sal sódica 2-hidrato
EE	error estándar
ET	elemento transponible
FAQ	<i>flowering arabidopsis QTL</i>
FR	frecuencia de recombinación
FTR	factor de transcripción
GL	grupo de ligamiento
h^2	heredabilidad
HCl	ácido clorhídrico
IM	mapeo de intervalos
INDEL	inserción-delección
kb	kilobase
KCl	cloruro potásico
L	litro
LIs	líneas de introgresión
LOD	logaritmo de la probabilidad (Logarithm of Odds)
M	molar
Mb	megabase
MF	mapa físico
MG	mapa genético
mg	miligramo
MgCl₂	cloruro magnésico
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MQM	modelo de múltiples QTLs
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	medio de cultivo Murashige-Skooge
N	número de individuos
NaCl	cloruro sódico
NHC	número de hojas caulinares
NHR	número de hojas de roseta
NTH	número total de hojas

NV	no vernalizado
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
QTL	locus de carácter cuantitativo (quantitative trait locus)
QTG	gen responsable del QTL (quantitative trait gene)
QTN	nucleótido responsable del QTL (quantitative trait nucleotide)
QTL x A	QTL por ambiente
RILs	líneas recombinantes consanguíneas (recombinant inbred lines)
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
siRNA	ácido ribonucleico de interferencia pequeño
SNP	polimorfismo de un nucleótido (single nucleotide polymorphism)
SSD	descendiente de semilla única (single seed descent)
SSLP	polimorfismo de longitud de secuencia simple (simple sequence length polymorphism)
TABF	tiempo de aparición del botón floral
TBE	Tris-HCl, ácido bórico, EDTA
T-DNA	ácido desoxirribonucleico de transferencia
TF	tiempo de floración
VDC	vernalizado día corto
VDL	vernalizado día largo
µg	microgramo
µL	microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
Figura 2. Tipos de accesiones de arabis.....	9
Figura 3. Modelo genético de control del tiempo de floración en arabis.....	10
Figura 4. QTLs para el tiempo de floración en arabis.....	19
Figura 5. Haplotipos de <i>CRY2</i> de las secuencias proteicas de <i>CRY2</i>	20

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 6. Material vegetal de partida y diseño experimental para la mendelización de <i>FAQ3</i>	30
Figura 7. Material vegetal de partida y diseño experimental para la mendelización y caracterización de <i>FAQ2</i>	31

RESULTADOS

1. Disección genética de la variación para el tiempo de floración en respuesta a la vernalización en la población de RILs *Ler/LI-0*

Figura 8. Respuesta de floración a la vernalización de <i>Ler</i> y <i>LI-0</i>	45
Figura 9. Fenotipo de floración de <i>Ler</i> y <i>LI-0</i> en respuesta a la vernalización.....	46
Figura 10. Comportamiento de floración de híbridos F_1 (<i>Ler</i> x <i>LI-0</i>).....	46
Figura 11. Mapa genético de la población de RILs de <i>Ler/LI-0</i>	48
Figura 12. Distorsión de la segregación de homocigotos en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	49
Figura 13. Distorsión de la segregación de heterocigotos en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	49
Figura 14. Comparación de las distancias genéticas y físicas en el mapa genético <i>Ler/LI-0</i>	50
Figura 15. Distribuciones de frecuencias del TF y NTH en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	52
Figura 16. Correlaciones de NTH y TF entre los distintos ambientes	54
Figura 17. Correlación entre TF y NTH en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	55
Figura 18. Mapeo de QTLs de floración en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	58
Figura 19. Perfiles de LOD para el número total de hojas (NTH).....	59
Figura 20. Interacción entre los QTLs de efecto mayor en la población de RILs <i>Ler/LI-0</i>	59

2. Caracterización genética del locus *FAQ3*, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos

Figura 21. Efecto del alelo <i>FAQ3-Shak</i> en el tiempo de floración en condiciones de día largo.....	61
Figura 22. Efecto del alelo <i>FAQ3-Shak</i> en el tiempo de floración en condiciones de día corto.....	62
Figura 23. Relación de dominancia entre los alelos de <i>FAQ3</i>	63
Figura 24. Distribución del NTH en una población segregante para <i>FAQ3</i>	63
Figura 25. Relación de dominancia entre los alelos de <i>FAQ3</i> en una población F_2	64
Figura 26. Diseño experimental para la obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión.....	65
Figura 27. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región <i>FAQ3</i>	66
Figura 28. Mapeo fino de <i>FAQ3</i>	67

3. Caracterización genética del locus *FAQ2*, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos

Figura 29. Efecto de los alelos <i>FAQ2</i> en el NTH.....	69
Figura 30. Efecto de los alelos <i>FAQ2</i> en el TF.....	70
Figura 31. Relación de dominancia de los distintos alelos de <i>FAQ2</i> para el NTH.....	71
Figura 32. Relación de dominancia de los alelos <i>FAQ2-Ri-0</i> y <i>FAQ2-Shak</i> para el TF.....	72
Figura 33. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región <i>FAQ2-C24</i>	74
Figura 34. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región <i>FAQ2-Ri-0</i>	75
Figura 35. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región <i>FAQ2-Shak</i>	77
Figura 36. Mapeo fino de los alelos <i>FAQ2</i>	78
Figura 37. Efecto de los dos loci <i>FAQ2-C24</i> en el tiempo de floración en condiciones de día largo.....	79
Figura 38. Efecto de los dos loci <i>FAQ2-C24</i> en el tiempo de floración en condiciones de día corto.....	80
Figura 39. Relación de dominancia de los alelos <i>FAQ2-C24-A</i> Y <i>FAQ2-C24-B</i>	81
Figura 40. Reconstrucción del fenotipo temprano a partir de líneas <i>FAQ2-C24-A</i> y <i>FAQ2-C24-B</i>	82
Figura 41. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-C24</i> a la luz roja...83	
Figura 42. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-C24</i> a la luz infrarroja.....	84
Figura 43. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de <i>FAQ2-C24</i> a la luz azul...85	
Figura 44. Análisis haplotípico de <i>CRY2</i> en las accesiones parentales.....	86

DISCUSIÓN

Figura 45. Mapeo comparativo de los QTLs de tiempo de floración identificados en distintos cruzamientos de <i>arabidopsis</i>	90
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Genes de arabisidopsis implicados en la variación natural para el tiempo de floración.....	21
Tabla 2. Genes implicados en la variación natural para el tiempo de floración en plantas cultivadas.....	24

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3. Marcadores moleculares de tipo SSLP utilizados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.....	36
Tabla 4. Marcadores moleculares de tipo INDEL desarrollados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.....	38
Tabla 5. Marcadores moleculares de tipo CAPS desarrollados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.....	38
Tabla 6. Marcadores moleculares utilizados en la selección de líneas de introgresión FAQ3 y FAQ2	39
Tabla 7. Marcadores moleculares utilizados en la obtención de líneas de mini-introgresión en la región FAQ3.....	40
Tabla 8. Marcadores moleculares utilizados en la obtención de líneas de mini-introgresión en la región FAQ2.....	41
Tabla 9. Marcadores moleculares utilizados en el análisis haplotípico de CRY2.....	41
Tabla 10. Umbrales de valor LOD para la detección de QTLs.....	43

RESULTADOS

1. Disección genética de la variación para el tiempo de floración en respuesta a la vernalización en la población de RILs Ler/LI-0

Tabla 11. Parámetros estadísticos de los caracteres de floración en la población de RILs Ler/LI-0.....	53
Tabla 12. QTLs de floración de la población de RILs Ler/LI-0.....	57

I. INTRODUCCIÓN

1. Variación genética natural en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una especie anual de la familia de las crucíferas con una amplia distribución geográfica que cubre gran variedad de ambientes (**Figura 1**). Las poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana* (referida en el resto del texto como arabisidopsis) se localizan desde zonas ecuatoriales hasta regiones árticas y desde altitudes superiores a 4000 metros en el Himalaya hasta el nivel del mar en la Península Ibérica y los Países Bajos (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000; Hoffmann, 2002; Koornneef y col., 2004; Shindo y col. 2007). Los individuos de estas poblaciones difieren genéticamente en numerosos caracteres, lo que presumiblemente refleja adaptaciones a los distintos ambientes (Alonso-Blanco y col., 2005a; Mitchell-Olds y Schmitt, 2006). Esta variación genética intraespecífica se conoce como variación genética natural y actualmente es el objeto de estudio de numerosos laboratorios.

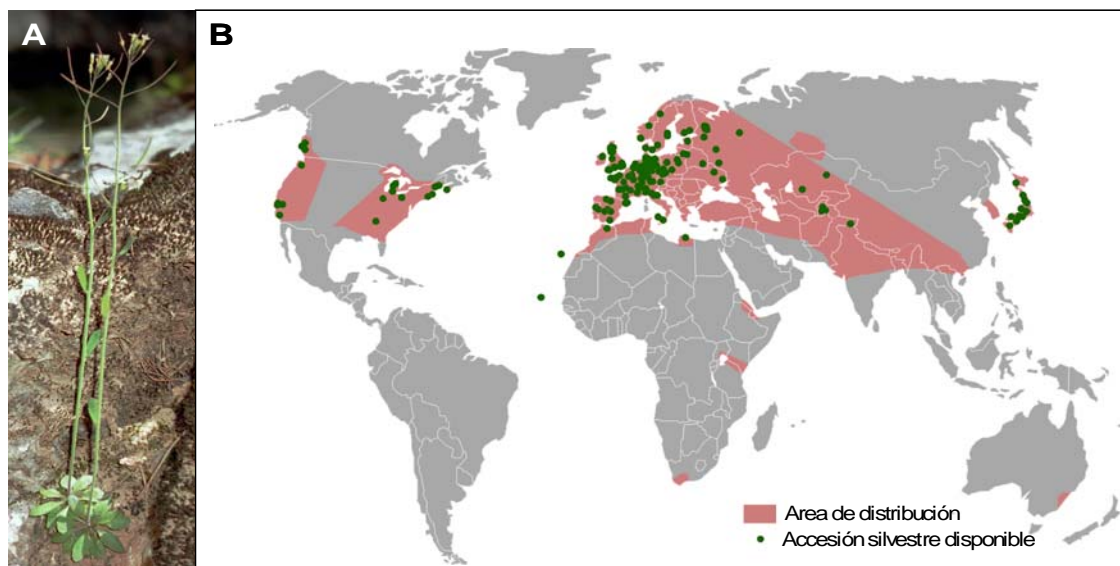


Figura 1. *Arabidopsis thaliana*. A. Ejemplares de *Arabidopsis thaliana* en condiciones naturales. B. Distribución geográfica mundial de arabisidopsis.

En arabisidopsis se ha identificado variación genética natural para multitud de caracteres que afectan a aspectos muy diferentes de la biología vegetal (revisado en Alonso-Blanco y Koornneef, 2000; Koornneef y col., 2004; Alonso-Blanco y col., 2005a; Mitchell-Olds y Schmitt, 2006; Shindo y col., 2007) como son las resistencias a factores bióticos como bacterias, hongos e insectos (Kroymann y col., 2003; Llorente y col., 2005; Perchepied y col., 2006; Zhang y col., 2006; Kusnierczyk y col., 2007), tolerancias a factores abióticos como la helada (Alonso-Blanco y col., 2005b; Hannah y col., 2006), la sequía (Mckay y col., 2003), la luz ultravioleta (Cooley y col., 2001) y las altas concentraciones de sales (Quesada y col., 2002; Harada y Leigh, 2006) y de metales (Kobayashi y Koyama, 2002; Hoekenga y col., 2003). Además se ha descrito variación natural para caracteres relacionados con el metabolismo primario y secundario como son la composición de lípidos y oligosacáridos de semillas (Millar y Kunst, 1999; Bentsink y col., 2000), la composición de monosacáridos de la pared celular primaria (Mouille y col., 2006), los contenidos de carbohidratos (Calenge y col., 2006), de glucosinolatos (Kliebenstein y col., 2001) o de azufre (Loudet y col., 2007) y numerosas actividades de enzimas (Mitchell-Olds y Pedersen, 1998; Sergeeva y col., 2004; Keurentjes y col., 2006). Por otra parte, se ha observado variación para caracteres fisiológicos como el ritmo circadiano (Swarup y col., 1999; Michael y col., 2003), el control temporal de la germinación o la dormición de las semillas (Alonso-Blanco y col., 2003; Bentsink y col., 2006) y respuestas a distintas condiciones de luz y tratamientos hormonales (King y Stimart, 1998; Borevitz y col., 2002; van Leeuwen y col., 2007). Por último también se ha descrito una gran variación para caracteres de desarrollo como la forma de las flores (Juenger y col., 2000), de las hojas (Pérez-Pérez y col., 2002) y de las raíces (Mouchel y col., 2004; Loudet y col., 2005), el patrón de

ramificación (Alonso-Blanco y col., 1999), la tasa de crecimiento (Kroymann y Mitchell-Olds, 2005) y el tiempo de floración (Alonso-Blanco y col., 1998a; Loudet y col., 2002; El-Lithy y col., 2006).

La variación observada es cualitativa o discreta para algunos de estos caracteres, como ocurre con los fenotipos glabro y erecto o con ciertos fenotipos de resistencia y susceptibilidad a patógenos. Sin embargo, la mayor parte de la variación genética presente en la naturaleza se traduce fenotípicamente en variación continua o cuantitativa (Alonso-Blanco y col., 2005a; Barton y Keightley, 2002; Doerge, 2002; Wu y Lin, 2006). La variación de los caracteres cuantitativos, a diferencia de los cualitativos, viene determinada por múltiples loci, que contribuyen parcialmente al fenotipo, y por el ambiente. Además, los efectos de los loci participantes se modifican por interacciones con otros loci (epistasia) (Tanksley, 1993; Lynch y Walsh, 1998; Kroymann y Mitchell-Olds, 2005) o con el ambiente en el que se analizan (Paran y Zamir, 2003; Fridman y col., 2004; Tonsor y col., 2005). Cada uno de los loci se denomina QTL por *Quantitative Trait Locus* y los caracteres que controlan se conocen como caracteres cuantitativos o complejos y son considerablemente más numerosos que los caracteres cualitativos (Kearsey y Pooni, 1994; Falconer y McKay 1996).

Dos caracteres cuantitativos que muestran una amplia variación genética son el tiempo de inicio de la germinación y el de floración, que son caracteres de la historia vital de la planta (*life history traits*) (Koornneef y col., 2004; Tonsor y col., 2005; Alonso-Blanco y col., 2005a; Mitchell-Olds y Schmitt, 2006; Shindo y col., 2007). *Arabidopsis* es una especie anual y como en otras especies anuales la duración del ciclo vital postembrionario es variable dependiendo fundamentalmente del momento en el que se inician los procesos de germinación y de floración. La variación para estos caracteres refleja posibles adaptaciones a distintos ambientes mediante modificaciones de la historia vital. El inicio de la germinación es el tiempo transcurrido desde la formación y maduración de la semilla hasta el momento de la germinación, lo que viene determinado por el estado de dormición de la semilla. Aunque este carácter no se ha analizado exhaustivamente, sí que se ha identificado considerable variación genética entre genotipos silvestres conservados en bancos de semillas (accesiones) (Nordborg y Bergelson, 1999). El inicio de la floración determina el tiempo transcurrido desde la germinación hasta que se inicia el desarrollo reproductivo, definiendo por tanto el tiempo del desarrollo vegetativo de la planta. En *Arabidopsis* cuando distintas accesiones silvestres se cultivan en las mismas condiciones ambientales se observa una gran variación fenotípica natural para el tiempo del inicio de floración, habiéndose descrito dos comportamientos generales extremos que permiten diferenciar accesiones de ciclo largo o anuales invernales y accesiones de ciclo corto o anuales de primavera (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000; Koornneef y col., 2004; Tonsor y col., 2005) (**Figura 2**). Las accesiones de ciclo largo florecen tardíamente en condiciones de laboratorio, pero aceleran su floración si reciben un tratamiento prolongado de temperaturas bajas (0-10°C). En condiciones naturales, para florecer en primavera, estas accesiones han de pasar un periodo de temperaturas bajas (0-10°C) típicas de la estación invernal de climas templados ya que sino su floración se retrasa. Este efecto de aceleración de la floración por temperaturas bajas se conoce como vernalización (Koornneef, 1991; Sung y Amasino, 2005; Amasino, 2005). Por ello, en condiciones naturales las accesiones de ciclo largo pasan el invierno en estado de roseta vegetativa, y en general, estos genotipos muestran una dormición de semilla reducida (Nordborg y Bergelson, 1999). Por el contrario, las accesiones de ciclo corto florecen tempranamente y casi al mismo tiempo independientemente de si reciben o no un tratamiento de vernalización, por lo que completan su ciclo vital postembrionario en pocos meses (Sung y Amasino, 2004a; Lempe y col., 2005). En condiciones naturales, estas accesiones germinan a finales del invierno, por lo que en general muestran una mayor dormición de semilla (Koornneef y col. 2004; Alonso-Blanco y col., 2005; Shindo y col., 2007). En condiciones de laboratorio, una gran parte de las accesiones presentan fenotipos intermedios entre estos dos comportamientos extremos, si bien se desconoce su comportamiento y significado en la naturaleza (Koornneef y col. 2004; Shindo y col., 2007).



Figura 2. Tipos de accesiones de arabidopsis

A la izquierda se muestra una planta florecida de una accesión de ciclo corto (anual de primavera) y a la derecha una planta en estado de roseta vegetativa de una accesión de ciclo largo (anual de invierno). Las plantas se crecieron simultáneamente durante 40 días en condiciones controladas de fotoperiodo de día largo.

Actualmente, en numerosos laboratorios se está llevando a cabo el análisis genético y molecular de la variación natural para el tiempo de inicio de la floración, tanto en arabidopsis como en algunas especies cultivadas (Alonso-Blanco y col., 2005a). En este contexto, el trabajo realizado en esta tesis se

propone determinar nuevos componentes genéticos implicados en la variación natural del tiempo de floración en arabidopsis. Estos estudios permiten identificar nuevos genes y alelos implicados en la regulación de este proceso y lo que es más importante, determinar los mecanismos moleculares de adaptación de las plantas a distintos ambientes. Este conocimiento es importante desde el punto de vista ecológico, evolutivo así como biotecnológico pues podría tener aplicaciones en la mejora genética de especies cultivadas. A continuación, se describe brevemente el estado actual del conocimiento del control genético y molecular del tiempo de floración en arabidopsis.

2. Control genético y molecular del tiempo de floración en arabidopsis

El tiempo de floración es un carácter crucial del desarrollo de las plantas ya que determina que la producción de semillas tenga lugar en la estación adecuada del año cuando las condiciones ambientales son favorables. Por ello, existen mecanismos precisos de control del inicio de este proceso (Murfet, 1977; Simpson y col., 1999; Putterill y col., 2004; Henderson y Dean, 2004; Ausin y col., 2005).

El tiempo de inicio de la floración está controlado tanto por factores ambientales como la temperatura y la luz que fluctúan de manera predecible a lo largo del año, como por factores endógenos relacionados con el estado de desarrollo de la planta. El papel de estos factores se ha descrito en numerosas revisiones (Yanovsky y Kay, 2002; Bernier y Périlleux, 2005; Ausin y col., 2005), por lo que aquí se describe brevemente su efecto general en la regulación del tiempo de floración de arabidopsis.

En arabidopsis, la temperatura invernal y la temperatura de crecimiento tienen un efecto importante sobre el inicio de la floración. Plantas cultivadas a 23°C florecen más rápidamente que cuando se cultivan a 16°C (Blázquez y col., 2003; Stinchcombe y col., 2004a; Lempe y col., 2005; Balasubramanian y col., 2006b). Por otro lado, las plantas procedentes de lugares con inviernos fríos necesitan una exposición prolongada a temperaturas bajas (0-10°C) para inducir o acelerar la floración en primavera. La mayoría de las accesiones de arabidopsis no muestran un requerimiento absoluto de temperatura baja (vernalización) para florecer. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente los genotipos de ciclo largo aceleran la floración en respuesta a dicho tratamiento más que los genotipos de ciclo corto (Napp-Zinn, 1985).

El tiempo de floración también se ve afectado por la luz, principalmente como consecuencia de dos parámetros: la longitud de onda y el fotoperiodo (duración del periodo de luz) (Levy y Dean, 1998). Con respecto a este parámetro, arabidopsis es una especie facultativa de día largo (DL), es decir, las plantas aceleran la floración cuando se cultivan en condiciones de fotoperiodo largo (más de 12 horas de luz por día) en comparación a cuando se cultivan en condiciones de día corto (DC), (menos de 12 horas de luz). En cuanto a la longitud de onda, la luz infrarroja y la luz azul aceleran la floración de arabidopsis mientras que la luz roja la retrasa (Cerdan y Chory, 2003).

La disección genética y molecular de la regulación del tiempo de floración de *Arabidopsis* se ha llevado a cabo de forma exhaustiva en los últimos 15 años, lo que ha permitido establecer un modelo molecular del control de la floración (**Figura 3**). Este análisis se ha basado principalmente en el estudio de variantes genéticas que presentan alteraciones en el tiempo de floración inducidas artificialmente mediante mutagénesis, (Koornneef y col., 1991; Ausin y col., 2005). Estos mutantes han identificado más de 100 genes que participan en la regulación de la floración, los cuales se han agrupado en distintas rutas dependiendo de su respuesta fenotípica al fotoperiodo y a la vernalización (Martínez-Zapater y col., 1994; Mouradov y col., 2002; Puterill y col., 2004; Henderson y Dean., 2004;). Además, el análisis de variantes genéticas naturales ha permitido aislar nuevos genes y alelos que no han sido identificados mediante el análisis de mutantes (Alonso-Blanco y col., 2005a; Shindo y col., 2007). La identificación molecular de los alelos inducidos artificialmente y de los alelos naturales, junto con el análisis de las interacciones genéticas entre ellos (Koornneef y col., 1998) ha permitido identificar tres rutas principales de promoción de la floración parcialmente independientes (Martínez-Zapater y col., 1994; Koornneef y col., 1998; Simpson y Dean, 2002; Mouradov y col., 2002; Puterill y col., 2004; Henderson y col., 2004). A continuación se describe brevemente la función de estas rutas y los principales genes que participan en cada una de ellas (**Figura 3**).

2.1 Ruta dependiente del fotoperiodo

Los mutantes de pérdida de función de genes asignados a la ruta dependiente del fotoperiodo se caracterizan por presentar fenotipo de floración tardía más severo en condiciones de DL que en condiciones de DC y por estar poco afectada su respuesta a la vernalización. Estos fenotipos indican que la ruta alterada se requiere para la floración principalmente en condiciones de DL.

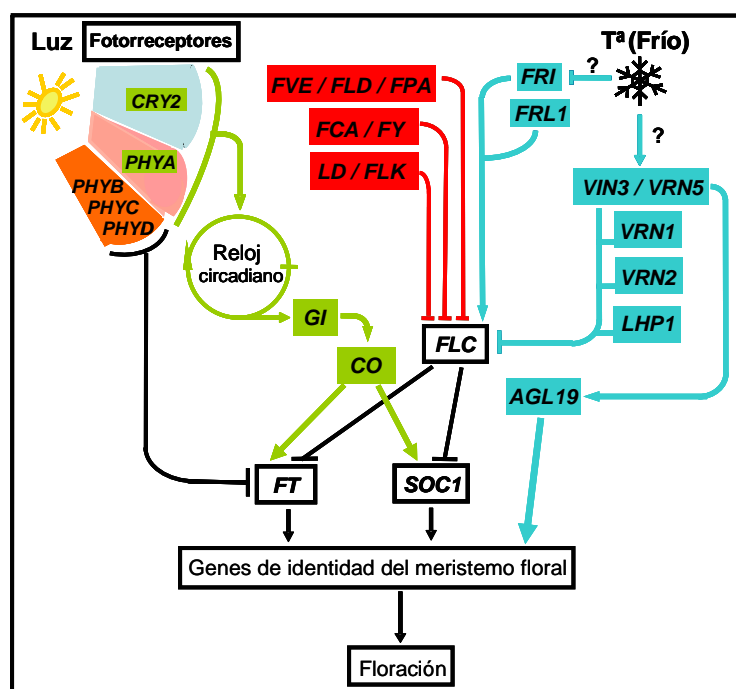


Figura 3. Modelo genético de control del tiempo de floración en *Arabidopsis*.

En color verde se muestran los genes que pertenecen a la ruta del fotoperiodo, en color azul los genes de la ruta de la vernalización y en rojo los genes de la ruta autónoma. Las cajas negras indican los genes que funcionan como integradores en los que convergen varias rutas de floración. Las flechas indican inducción y las barras represión.

La ruta del fotoperiodo se compone de los fotorreceptores criptocromo 2 (*CRY2*) y fitocromo A (*PHYA*), del reloj circadiano y de los integradores florales *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*) (**Figura 3**). Todos los genes de esta ruta presentan una regulación circadiana de su expresión (Fowler y col., 1999; Devlin y Kay, 2000; Suarez-López y col., 2001;). Los fotorreceptores *CRY2* y *PHYA* perciben la luz y transmiten una señal al reloj circadiano permitiendo la medición del fotoperiodo por la planta. De esta forma

CRY2 y *PHYA* regulan positivamente la floración ya que mutantes de pérdida de función en ambos genes causan fenotipos de floración tardía (Mockler y col., 2003).

El ritmo circadiano en *arabidopsis* se genera por la actividad de los genes *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA)* y *TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1)* que son los componentes del oscilador central (Wang y Tobin, 1998; Strayer y col., 2000; Alabadi y col., 2001). Se ha demostrado que el reloj circadiano regula la expresión de *GIGANTEA (GI)* y *CONSTANS (CO)*. El gen *GI* codifica una proteína con posibles dominios transmembrana (Fowler y col., 1999) y *CO* codifica un factor de transcripción con dos dedos de zinc relacionado con la familia de factores de tipo GATA (Putterill y col., 1995). Los análisis de los mecanismos moleculares de regulación del inicio de floración por fotoperiodo están de acuerdo con un modelo de coincidencia externa (Yanovsky y Kay, 2002; revisado en Ausin y col., 2005). Este modelo implica la regulación de la actividad de la proteína *CO* por luz a través de *CRY2* y *PHYA*, de manera que cuando la máxima expresión de *CO* coincide con el periodo de luz se mantiene la actividad de la proteína *CO*. Apoyando este modelo, se ha demostrado que la luz azul afecta a la estabilidad de la proteína *CO* de manera que en la oscuridad esta proteína se degrada mediante su marcaje con ubiquitina (Valverde y col., 2004).

Por otra parte los fotorreceptores de luz roja como los fitocromos B, C y D (*PHYB*, *PHYC* y *PHYD*) participan en la respuesta al fotoperiodo de *arabidopsis* y se comportan como represores ya que alelos de pérdida de función de estos genes causan un fenotipo de floración temprana más intenso en condiciones de DC que en DL (Reed y col., 1994; Aukerman y col., 1997; Balasubramanian y col., 2006b). Se ha propuesto que estos genes participan en la respuesta al fotoperiodo de *arabidopsis* mediante su efecto sobre *FT* independientemente de la ruta del fotoperiodo (Cerdan y Chory, 2003) (Figura 1).

El estudio de la función molecular de los genes de la ruta del fotoperiodo ha demostrado que *CO* regula la expresión de los genes *FT* y *SOC1* que funcionan como integradores florales (Onouchi y col., 2000; Moon y col., 2005) (**Figura 3**). *FT* codifica una proteína con homología a proteínas inhibidoras de Kinasas Raf de animales (RKIP) (Kardailsky y col., 1999; Kobayashi y col., 1999; Cremer y Coupland, 2003) y *SOC1* codifica un factor de transcripción de tipo MADS. *FT* y *SOC1* activan la expresión de los genes de identidad del meristemo floral. Además, *FT* y *SOC1* funcionan como integradores de varias de las rutas de promoción de la floración (**Figura 3**) ya que su expresión está alterada en muchos mutantes de genes que participan en otras rutas de floración (Chou y col., 2001; Kotake y col., 2003; Piñeiro y col., 2003; Takada y Goto 2003; Oda y col., 2004; Moon y col., 2005; Yoo y col., 2005). Recientemente se ha demostrado tanto en *arabidopsis* como en arroz que la proteína *FT* se produce en las hojas y se desplaza por el floema hasta el meristemo apical del tallo (Corbesier y col., 2007; Tamaki y col., 2007). En el meristemo apical, *FT* junto a un factor de transcripción de la familia BZIP denominado *FD*, podría formar un complejo de regulación transcripcional que induce la floración como consecuencia de la activación de la expresión de *APETALA1 (AP1)* y otros genes de desarrollo floral. Además, en tomate, tabaco y *Cucurbita*, experimentos con injertos que sobreexpresan el gen de tomate *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* (ortólogo de *FT*) en las dos primeras especies y el gen ortólogo de *FT* de *arabidopsis* en *Cucurbita*, sugieren que las proteínas *SFT* y *FT* de *Cucurbita* también se desplazan desde las hojas hasta el meristemo apical induciendo la floración (Lifschitz y col., 2006; Lin y col., 2007). Estos resultados han conducido a proponer que la proteína *FT* es la señal inductora de la floración descrita como “florigeno” o estímulo floral hace 70 años y cuya naturaleza se desconocía (revisado en Kobayashi y Weigel, 2007).

2.2 Ruta de la vernalización.

La segunda ruta de regulación del inicio de la floración comprende los genes que se requieren para la inducción de la floración mediada por vernalización. Las plantas vernalizadas no florecen de forma inmediata, sino que la aceleración de la floración se produce posteriormente al tratamiento de vernalización y es proporcional al tiempo del tratamiento (Amasino, 2005).

Esta característica de la vernalización implica que las plantas vernalizadas “recuerdan” la exposición a temperaturas bajas durante las fases tempranas de su desarrollo y sugiere una regulación epigenética de la floración que ha empezado a comprenderse en los últimos años (revisado en Sung y Amasino, 2006b; Dennis y Peacock, 2007; Schmitz y Amasino, 2007; Jarillo y col., 2008). La identificación de los genes responsables de la respuesta a la vernalización se realizó a partir del análisis de variantes naturales de *arabidopsis*. Los primeros análisis genéticos de la variación natural para el requerimiento de vernalización permitieron detectar dos loci con efectos cualitativos, *FRIGIDA* (*FRI*) (Lee y col., 1993; Clarke y Dean, 1994) y *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (Lee y col., 1994; Koornneef y col., 1994), responsables de las diferencias en el tiempo de floración entre la accesión tardía Stockholm y la temprana Limburg-5. La identificación de estos dos loci no habría sido posible mediante el análisis de las cepas comunes de laboratorio *Ler*, *Col* y *Ws* ya que éstas poseen alelos de pérdida de función total o parcial en uno o en ambos loci. El gen *FRI* es el que explica mayor proporción de la variación para el tiempo de floración entre las accesiones (Clarke y Dean, 1994; Shindo y col., 2005). Alelos dominantes en *FRI* y *FLC* interactúan de manera sinérgica produciendo un retraso en la floración de muchas accesiones de *arabidopsis* cuando no se vernalizan, el cual se revierte mediante el tratamiento con bajas temperaturas. Ambos loci se han aislado a nivel molecular, mostrando que *FRI* codifica una proteína sin homología a otras proteínas conocidas (Johanson y col., 2000) mientras que *FLC* codifica un factor de transcripción con un dominio MADS (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon y col., 2000). El análisis molecular de estos dos genes indica que *FRI* regula positivamente la expresión de *FLC*, mientras que *FLC* reprime la expresión de los integradores florales *SOC1* (Onouchi y col., 2000; Helliwell y col., 2006) y *FT* (Helliwell y col., 2006; Searle y col., 2006) (**Figura 3**). En el genoma de *arabidopsis* existen seis genes homólogos a *FRI*. Mutaciones en uno de ellos, *FRI LIKE1* (*FRL1*), indican que este gen también es necesario para la activación de *FLC* mediada por *FRI* (Michaels y col., 2004). Sin embargo, la sobreexpresión de *FRI* y *FRL1* por separado o simultáneamente, no provoca un retraso en la floración, lo que hace suponer que se requiere al menos otro factor adicional (Michaels y col., 2004).

FLC juega un papel clave en la ruta de vernalización pues la exposición a temperaturas bajas tiene como efecto la represión de su expresión (Sheldon y col., 2000) (**Figura 3**). Se ha demostrado que la reducción de los niveles de mRNA de *FLC* es proporcional a la duración del tratamiento de vernalización hasta que se alcanza un nivel de saturación (Sheldon y col., 2000). No obstante, la promoción de la floración causada por vernalización no se debe exclusivamente a la regulación de *FLC* ya que plantas portadoras de un alelo nulo de *FLC* mantienen cierta respuesta a la vernalización (Michaels y Amasino, 2001). Ésto sugiere que hay otros genes implicados en esta respuesta, como por ejemplo los genes *MADS AFFECTING FLOWERING* (*MAF*) homólogos de *FLC* (Scortecci y col., 2001; Ratcliffe y col., 2001 y 2003). Recientemente se ha demostrado que la vernalización no sólo reprime la expresión de factores de transcripción tipo MADS sino que también activa otros factores MADS como *AGAMOUS LIKE19* (*AGL19*). A diferencia de su homólogo *FLC*, *AGL19* funciona como un regulador positivo de la floración (Schönrock y col., 2006; revisado en Jarillo y col., 2008) (**Figura 3**). El análisis de mutantes de *AGL19* y *FLC* ha mostrado que la expresión de cada gen no influye en la del otro, por lo que *AGL19* y *FLC* parecen funcionar de forma independiente en la ruta de vernalización (Schönrock y col., 2006).

El mecanismo molecular mediante el cual la vernalización regula la expresión de *FLC* se ha establecido mediante la selección de mutantes alterados específicamente en esta respuesta, como *vrn1*, *vrn2* y *vin3* que impiden la reducción de los niveles de expresión de *FLC* mediada por temperaturas bajas (Chandler y col., 1996; Sung y Amasino, 2004b) (**Figura 3**). *VERNALIZATION2* (*VRN2*) codifica una proteína nuclear con homología a proteínas del grupo Polycomb de *Drosophila* implicadas en remodelación de cromatina (Gendall y col., 2001); *VERNALIZATION1* (*VRN1*) codifica una proteína con dominios de unión inespecífica a DNA (Levy y col., 2002); *VERNALIZATION INDEPENDENT3* (*VIN3*) codifica una proteína con un

dominio PHD (*Plant Homeodomain-Finger*) que se encuentra frecuentemente en proteínas que forman parte de complejos de remodelación de cromatina (Fair y col., 2001; Sung y Amasino, 2004b). En los mutantes *vrn1* y *vrn2*, la vernalización provoca una reducción de la expresión de *FLC* similar a la observada en la cepa silvestre. Sin embargo, a diferencia de la cepa silvestre, la expresión de *FLC* se recupera rápidamente cuando estas plantas mutantes son transferidas a temperaturas de crecimiento normales, lo que indica que el papel de *VRN1* y *VRN2* no es la reducción de *FLC* sino el mantenimiento del estado vernalizado a lo largo del desarrollo posterior de la planta (Gendall y col., 2001; Levy y col., 2002). Por el contrario, *VIN3* se requiere para el establecimiento de la represión de *FLC* durante el tratamiento de vernalización y podría estar implicado en la medición de la duración del tratamiento de vernalización pues su expresión aumenta proporcionalmente a dicho tratamiento (Sung y Amasino, 2004b). Se ha observado que la regulación de la expresión de *FLC* mediada por vernalización está asociada a la desacetilación y metilación de histonas y que los mutantes *vrn1* y *vrn2* presentan distintas alteraciones del patrón de metilación de la cromatina de *FLC* (Bastow y col., 2004). Estos resultados indican que *VRN1* y *VRN2* están implicados en diferentes aspectos de metilación de las histonas al igual que *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1)* y *VERNALIZATION5 (VRN5 o VIL1 por VIN3-LIKE1)* que han sido identificados recientemente (Sung y col., 2006a; Greb y col., 2007). *LHP1*, también conocido como *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)*, codifica una proteína homóloga a HP1 de *Drosophila* y está implicada en el mantenimiento de la metilación de histonas de *FLC* y en la estabilización de su represión después del tratamiento de vernalización. Por el contrario, *VRN5* codifica una proteína muy similar a *VIN3* (con un dominio PHD) que podría participar junto a éste en un complejo de desacetilación y metilación de histonas de *FLC* durante la vernalización.

2.3 Ruta autónoma

Los mutantes de pérdida de función de genes asignados a la ruta autónoma se caracterizan por presentar un fenotipo de floración tardía independientemente de las condiciones de fotoperiodo. El fenotipo de floración de estos mutantes correlaciona con niveles altos de mRNA de *FLC* y se revierte por vernalización (Koorneef y col., 1991). Además, mutaciones de pérdida de función en *FLC* suprimen el fenotipo tardío de todos los mutantes de esta ruta (Michaels y Amasino, 2001). Estos resultados han permitido concluir que la función principal de la ruta autónoma es reprimir la expresión de *FLC* (**Figura 3**). De esta forma las rutas autónoma y de vernalización convergen en *FLC*, que actúa de integrador de las señales de ambas rutas. Clásicamente en la ruta autónoma se han identificado siete genes: *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FCA*, *FY*, *FPA*, *FLK*, *FLD* y *FVE*, (Redei, 1962; Koorneef y col., 1991; Sanda y Amasino, 1996). *LD* codifica una proteína nuclear con un dominio homeobox (Lee y col., 1994) mientras que el resto de los genes codifican proteínas que interaccionan con RNA o proteínas que participan en procesos de modificación de cromatina. Los miembros del primer grupo (*FCA*, *FY*, *FPA* y *FLK*) codifican proteínas que presentan dominios de unión a RNA por lo que podrían participar en el procesamiento de este tipo de moléculas (Macknight y col., 1997; Schomburg y col., 2001; Quesada y col. 2003; Lim y col., 2004). En esta línea se ha demostrado que *FCA* interacciona con *FY* para regular su propia expresión a nivel post-transcripcional (Simpson y col., 2003). Por otro lado, *FLD* y *FVE* son proteínas homólogas a las proteínas que forman parte de complejos implicados en la desacetilación de histonas y participan en la remodelación de la cromatina de *FLC* (He y col., 2003; Ausin y col., 2004). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de mecanismos epigenéticos de modificación de histonas en la regulación de la floración por la ruta autónoma en *Arabidopsis* (He y col., 2003). Recientemente se han identificado componentes adicionales de las rutas autónoma y de vernalización que también participan en la regulación epigenética de *FLC* (revisado en Schmitz y Amasino, 2007; Jarillo y col., 2008).

Como hemos visto *FLC* integra señales de las rutas de vernalización y autónoma y regula negativamente a los integradores florales *FT* y *SOC1*, regulados a su vez positivamente por la ruta dependiente del fotoperiodo (Kardailsky y col., 1999; Kobayashi y col., 1999;

Samach y col., 2000; Michaels y Amasino, 2001; Searle y col., 2006) (**Figura 3**). Esta convergencia parcial indica que las distintas rutas funcionan coordinadamente para regular un número limitado de integradores. Además las rutas de promoción de la floración no son totalmente independientes ya que se ha mostrado que *CRY2* afecta a la expresión de *FLC* (El-Assal y col., 2003). Es de esperar que en el futuro se identifiquen más interacciones entre las tres rutas de control del tiempo de floración.

3. Análisis genético y molecular de la variación natural en *arabidopsis*

Arabidopsis thaliana se ha convertido también en la especie modelo no sólo para estudios de biología molecular sino para el análisis de la variación genética natural (Koornneef y col., 2004; Tonsor y col., 2005; Alonso-Blanco y col., 2005a; Mitchell-Olds y Schmitt, 2006). Esta elección se basa principalmente en la disponibilidad de dos recursos fundamentales:

En primer lugar en *arabidopsis* existe un gran número de materiales específicos para el estudio de su variación natural. Así en los bancos de semillas se catalogan más de 1500 accesiones que cubren una amplia distribución geográfica y muestran gran variación genética (Koornneef y col., 2004; Shindo y col., 2007; <http://www.arabidopsis.org>). La naturaleza autógama y el carácter altamente homocigótico de las accesiones de *arabidopsis* ha facilitado la obtención de poblaciones de mapeo permanentes como las líneas recombinantes consanguíneas (*Recombinant Inbred Lines*: RILs). Hasta la fecha se han desarrollado 34 poblaciones de RILs que están disponibles para la comunidad científica y otras 37 están en proceso de desarrollo (<http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/RILs.htm>). El análisis de estas poblaciones experimentales está permitiendo la disección genética de numerosos caracteres complejos y la identificación y caracterización de QTLs implicados en la variación de caracteres cuantitativos con posible valor adaptativo en diferentes ambientes naturales (Koornneef y col., 2004; Weigël y Nordborg 2005).

En segundo lugar, en *arabidopsis* también existen numerosos recursos genómicos que facilitan la identificación de los genes responsables de los QTLs (Mitchell-Olds y Schmitt, 2006; <http://www.arabidopsis.org>). Esto ha sido posible principalmente gracias a la secuenciación de su genoma completo (AGI 2000), que ha permitido la re-secuenciación parcial de 20 accesiones y la disponibilidad de un número ilimitado de polimorfismos nucleotídicos de gran utilidad para el mapeo fino de loci (Lukowitz y col., 2000; Weigël y Nordborg 2005; <http://www.arabidopsis.org>; Clark y col., 2007; Kim y col., 2007). Además, actualmente se dispone de mapas físicos y genéticos (<http://www.arabidopsis.org>); de numerosas colecciones de mutantes de inserción de transposones o T-DNA y de mutantes obtenidos por mutágenos físicos o químicos, útiles para el análisis funcional de la mayoría de los genes de *arabidopsis* (alrededor de 25.000) (Goodman y col., 1995; Bouchez y Hofte, 1998; Koornneef y col., 2004; Weigël y Nordborg 2005); de microordenamientos de genoma completo para el análisis de expresión a nivel genómico y de colecciones de cDNA completos de todo el genoma en vectores universales de alta versatilidad.

La disponibilidad de estas herramientas ha promovido un aumento del análisis genético y molecular de la variación genética natural de *arabidopsis* en los últimos años. Esto ha permitido identificar los primeros genes responsables de la variación natural para diversos caracteres y en particular para el control del tiempo de floración. A continuación se describe brevemente la metodología existente para el análisis de la variación genética natural de *arabidopsis* distinguiendo dos etapas consecutivas: la detección y localización genética de los QTLs y la identificación de los genes y los polimorfismos moleculares implicados.

3.1 Identificación y caracterización de QTLs

La detección y localización de los QTLs que determinan la variación genética natural se conoce como análisis o mapeo de QTLs y tiene como objetivo determinar la arquitectura genética de los caracteres cuantitativos de interés (Tanksley 1993; Alonso-Blanco y Koornneef 2000; Doerge, 2002; Alonso-Blanco y col., 2005a). La identificación de QTLs requiere

desarrollar poblaciones segregantes para el carácter de interés que son genotipadas con marcadores moleculares a lo largo del genoma. El posterior mapeo de los QTLs implica análisis estadísticos de asociación entre clases genotípicas y los valores fenotípicos de los individuos de cada clase (Alonso-Blanco y col., 2006). De esta forma se determina la arquitectura genética de un carácter, lo que incluye conocer el número de QTLs participantes, sus posiciones genéticas (en intervalos de confianza estadísticos) y sus efectos aditivos (absolutos y relativos). Dependiendo del tipo de población utilizada también se pueden estimar otros parámetros de los loci identificados como son la dominancia, las interacciones entre QTLs (epistasia) y las interacciones QTL x ambiente (QTL x A) (Holland, 2007).

En *arabidopsis*, el análisis genético de caracteres cuantitativos se ha realizado principalmente utilizando dos tipos de poblaciones de mapeo permanentes: las líneas recombinantes consanguíneas (RILs) y las líneas de introgresión cuasi-isogénicas (LIs) (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000; Koornneef y col., 2004; Alonso-Blanco y col., 2005a; Shindo y col., 2007; Keurentjes y col., 2007; Törjek y col., 2008). Las RILs se obtienen por el método del *descendiente de una única semilla* que consiste en autofecundar las plantas de una población F_2 durante seis generaciones (hasta la F_8) seleccionando una sola semilla por generación y planta. De esta forma la heterocigosis por locus se reduce aproximadamente al 0,5%, por lo que las plantas resultantes son prácticamente líneas homocigóticas. Las LIs se obtienen mediante varios retrocruzamientos con un parental recurrente seguido de su posterior autofecundación durante varias generaciones para la obtención de homocigosis. De esta forma se obtienen líneas que contienen regiones genómicas de una accesión donante (introgresiones) en el fondo genético de otra accesión de referencia (parental recurrente). En *arabidopsis* únicamente se han obtenido dos poblaciones de este tipo que cubren todo el genoma, una de las cuales se ha utilizado para estudiar la variación natural para el tiempo de floración (Keurentjes y col., 2007; Törjek y col., 2008). Un caso particular de LIs desarrolladas en *arabidopsis* son las denominadas STAIRS, que consisten en un conjunto de líneas con introgresiones solapantes que cubren un cromosoma completo. Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha obtenido una pequeña población de ocho líneas que cubren el cromosoma 3 (Koumproglou y col., 2002). Tanto las RILs como las LIs son mayoritariamente homocigóticas por lo que se pueden propagar por semillas indefinidamente. Esto permite que se puedan analizar para múltiples caracteres y en distintos ambientes por diferentes laboratorios, siendo genotipadas una sola vez en el momento de su obtención (Alonso-Blanco y Koornneef., 2000; Keurentjes y col., 2007). Además, el análisis de QTLs en poblaciones permanentes permite aumentar el número de replicas por línea, lo que disminuye la variación ambiental no controlada y aumenta el poder estadístico de la detección de QTLs y la precisión de su localización (Koornneef y col., 2004; Alonso-Blanco y col., 2006). La comparación del mapeo de QTLs entre RILs e LIs indica que si bien la localización de los QTLs de efecto mayor es considerablemente más precisa con las RILs que con las LIs, estas últimas permiten detectar mayor número de QTLs de efecto menor. Sin embargo, el análisis de QTLs en LIs no permite detectar epistasias entre los loci identificados (Keurentjes y col., 2007).

El mapeo primario de QTLs se realiza utilizando poblaciones pequeñas de los tipos descritos (100-200 líneas), lo que conduce a la identificación de un número de QTLs que generalmente varía entre 2 y 15 en intervalos de 5 a 30 cM dependiendo del efecto del locus (Kearsey y Farquhar, 1998; Salvi y Tuberosa, 2005). Los efectos relativos de los QTLs identificados varían desde alrededor del 5% de la varianza fenotípica hasta el 50%. Con el fin de analizar la contribución de los efectos relativos de los QTLs implicados en la variación genética natural para el inicio de la floración, hemos considerado QTLs de efecto menor los que explican menos del 10%, QTLs de efecto mayor los que explican más del 20% y QTLs de efecto moderado los que explican entre el 10% y el 20%. Los análisis de QTLs realizados con poblaciones permanentes suelen identificar en cada estudio un número pequeño de QTLs de efecto mayor (0 a 3) y un número mayor de QTLs de efecto moderado o menor (Kearsey y Farquhar, 1998). No obstante, la estima de los efectos relativos de los QTLs se ve afectada considerablemente por el tamaño de la población analizada de manera que en poblaciones

pequeñas el efecto de los QTLs menores está significativamente sobreestimado debido al denominado efecto Beavis (Xu y col., 2003). Esto implica que el número de QTLs con efectos moderados o menores es realmente mayor que el estimado en dichas poblaciones experimentales pequeñas.

Hasta la fecha, la mayor parte de los QTLs diseccionados a nivel molecular en todas las especies son de efecto mayor, salvo la notable excepción de dos QTLs de efecto menor implicados en el crecimiento (Kroymann y Mitchell-Olds, 2005). Esto es consecuencia del mayor esfuerzo necesario para el estudio de los QTLs de efecto moderado o menor. Kroymann y Mitchell-Olds demostraron experimentalmente la presencia de dos QTLs menores en una región genómica de 1cM, sugiriendo que puedan existir gran número de QTLs de efecto menor en el genoma y una enorme complejidad en la arquitectura de ciertos caracteres cuantitativos (Kroymann y Mitchell-Olds, 2005). Por otra parte, el efecto de los QTLs depende del ambiente en que se analizan, lo que se detecta por la presencia de interacciones QTL x A significativas, y del fondo genético, debido a las interacciones con otros QTLs. Esta complejidad la ilustra la interacción entre los dos QTLs de efecto menor mencionados anteriormente, cuyos efectos dependen del fondo genético (Kroymann y Mitchell-Olds, 2005). El análisis genético detallado de numerosos QTLs de *arabidopsis* y otras especies ha mostrado que la mayoría de los QTLs de efecto mayor se deben a un único gen. Sin embargo, en los últimos años se han identificado varios QTLs complejos que resultan de los efectos combinados de varios loci de efecto menor estrechamente ligados, tanto en animales (Mackay, 2004; Lee y col., 2006) como en plantas (Chen y Tanksley, 2004; Thomson y col., 2006).

Por último, además de las poblaciones experimentales descritas anteriormente, se están desarrollando colecciones de genotipos silvestres (accesiones) no emparentados cuyo análisis para la identificación de QTLs se denomina “mapeo por desequilibrio de ligamiento” o “mapeo por asociación genética”. Éste consiste en el análisis de estos genotipos tanto con marcadores moleculares a lo largo de todo el genoma, como a nivel fenotípico para el carácter de interés. Posteriormente, se lleva a cabo un análisis estadístico de asociación entre haplotipos y fenotipos dirigido a identificar qué variación nucleotídica se asocia a la variación fenotípica (Borevitz y Nordborg, 2003). Como cabría esperar, el desequilibrio de ligamiento entre marcadores de *arabidopsis* decae conforme aumenta la distancia física entre ellos, y prácticamente desaparece a distancias superiores a 50 Kb (Nordborg y col., 2005; Kim y col., 2007). En la especie humana esta técnica está permitiendo la detección de marcadores asociados a la susceptibilidad de padecer numerosas enfermedades (Carlson y col., 2004; Hinds y col., 2005). Aunque en plantas estas poblaciones aún no han sido utilizadas ampliamente (Rostoks y col., 2006), en *arabidopsis* hay varios ejemplos de su uso en la detección de genes previamente implicados en la variación natural para el tiempo de la floración (Olsen y col., 2004; Aranzana y col., 2005; Balasubramanian y col., 2006; Toomajian y col., 2006; Brock y col., 2007; Zhao y col., 2007) y para la resistencia a patógenos (Stahl y col., 1999; Tian y col., 2002; Mauricio y col., 2003).

3.2 Identificación de genes y polimorfismos moleculares responsables de variación natural

La identificación de las bases moleculares de la variación natural para el inicio de la floración requiere el aislamiento del gen o genes responsables de los caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Genes*: QTGs) y la detección de los polimorfismos génicos causantes de las diferencias fenotípicas (*Quantitative Trait Nucleotides*: QTNs). La clonación de un QTL requiere en primer lugar su mapeo fino en poblaciones experimentales que segreguen sólo para el QTL de interés. La obtención de poblaciones con segregación monogénica para un carácter de interés se conoce como mendelización del QTL (Alonso-Blanco y Koornneef, 2000; Koornneef y col., 2004). El mapeo fino permite delimitar la localización del QTL a una región de varias kilobases donde el número de genes predichos es pequeño (1 a 10 genes). Posteriormente, la identificación del gen concreto no puede basarse exclusivamente en la secuenciación de las variantes alélicas implicadas, ya que el número medio de polimorfismos entre accesiones es de

seis por cada kb (Schmid y col., 2003; Koornneef y col., 2004). Para distinguir qué polimorfismo es el responsable del QTL se utilizan diversas estrategias funcionales como son (Alonso-Blanco, 2005a):

1. La búsqueda de genes candidatos a partir de la función anotada en las bases de datos de la secuencia genómica.
2. El análisis fenotípico de mutantes disponibles específicamente para los genes candidatos de la región delimitada.
3. La búsqueda de genes candidatos mediante análisis transcriptómicos.
4. Análisis de asociación genética con variantes alélicas de genes candidatos.
5. La complementación genética en plantas transgénicas portadoras de distintos alelos del gen candidato. Esta última estrategia proporciona la demostración conclusiva del gen responsable del QTL.

4. Bases genéticas y moleculares de la variación genética natural para el tiempo de floración en arabidopsis.

4.1 Bases genéticas de la variación natural

El análisis de QTLs para el tiempo de floración en arabidopsis se ha realizado en numerosas poblaciones experimentales incluyendo una población de retrocruzamiento, dos poblaciones F_2 y ocho poblaciones de RILs (**Figura 4**) (Kowalski y col., 1994; Clarke y Dean, 1995; Jansen y col., 1995; Kuitinen y col., 1997; Alonso-Blanco y col., 1998a; Loudet y col., 2002; El-Lithy y col., 2004; Werner y col., 2005a; El-Lithy y col., 2006). La mayor parte de las poblaciones de RILs analizadas tienen como parentales una de las cepas de referencia Ler o Col ya que se dispone de la secuencia completa de Col y del 70% de la de Ler, lo que facilita el desarrollo de marcadores moleculares (AGI, 2000; Jander y col., 2002). El estudio comparativo de los mapeos de QTLs realizados en todas estas poblaciones (**Figura 4**) indica que hay en total al menos 21 QTLs que contribuyen a la variación genética natural para este carácter en arabidopsis, 18 de ellos identificados en condiciones de DL, 14 en DC y 13 en condiciones de vernalización (**Figura 4**). Los QTLs identificados en cada población y ambiente analizado presentan distintos efectos relativos de manera que en cada análisis se han detectado de 0 a 2 QTLs de efecto mayor y de 0 a 3 QTLs de efecto moderado. Además, la mayoría de los análisis identificaron varios QTLs de efecto menor, cuyo número varía de 0 a 7 dependiendo de la población y del ambiente. En todas las poblaciones excepto en una (Clarke y col., 1995) se han identificado mayor número de QTLs de efecto moderado y menor que de efecto mayor (**Figura 4**). En conjunto, estos QTLs de floración de efecto moderado y menor explican aproximadamente un 35% de la variación para el tiempo de floración, que es comparable a la variación explicada por los QTLs de efecto mayor.

Seis de los once mapeos de QTLs de floración realizados en arabidopsis han analizado la interacción entre QTLs y ambiente. De esta forma se ha mostrado que varios de los QTLs de floración de arabidopsis interaccionan con ambientes que difieren en fotoperiodo y temperatura (Clarke y col., 1995; Alonso-Blanco y col., 1998a; Jansen y col., 1995; Loudet y col., 2002; El-Lithy y col., 2004; Werner y col., 2005a). Así, se han detectado interacciones QTL x A en respuesta al fotoperiodo para QTLs de efecto mayor ligados a *EDI*, *FRI*, *FLW1* y *ART1* (Alonso-Blanco y col., 1998a; Loudet y col., 2002; Werner y col., 2005a; Clarke y col., 1995). Además, también se han detectado interacciones QTL x ambiente para QTLs de efecto menor y moderado ligados a *PHYB* y *PHYD* y a marcadores de la parte superior de los cromosomas 1 y 4 (Loudet y col., 2002; Werner y col., 2005a; El-Lithy y col., 2006). La interacción en respuesta a la vernalización únicamente se ha analizado en tres poblaciones experimentales, detectándose interacción QTL x A sólo en el caso de QTLs ligados a *FLC*, a un marcador de la parte media del cromosoma 1 y a *ART1* (Clarke y col., 1995; Alonso-Blanco y col., 1998a).

Además, los análisis de QTLs para el tiempo de floración en arabidopsis han detectado interacciones QTL x QTL en seis poblaciones (Clarke y col., 1995; Alonso-Blanco y col., 1998a;

Loudet y col., 2002; El-Lithy y col., 2006). En todas ellas, las interacciones detectadas más frecuentemente son las que implican a cinco QTLs de efecto mayor ligados a *FRI*, *FLC*, *ART1*, *EDI* y *FLW1*. Sólo en algunas poblaciones las interacciones implicaron QTLs de efecto menor ligados al gen *GI* del cromosoma 1, al gen *PHYD* del cromosoma 4 y a un marcador del extremo inferior del cromosoma 5 (El-Lithy y col., 2006). Probablemente, la escasa detección de interacciones que implican QTLs de efecto menor o moderado se deba a la menor resolución estadística asociada a estos loci en comparación con los QTLs de efecto mayor.

4.2 Identificación de genes y alelos responsables de la variación natural

Hasta la fecha se han diseccionado molecularmente cinco QTLs de efecto mayor para el tiempo de inicio de la floración, tres de ellos implicados en la ruta de la vernalización (*FRI*, *FLC* y *ART1*=*HUA2*) y dos en la ruta del fotoperiodo (*EDI*=*CRY2*) y *FLW1*=*FLM*) (Tabla 1, Figura 4). Además, los resultados de distintos análisis de asociación y la posterior complementación en plantas transgénicas, han identificado dos genes que codifican para los fotorreceptores de luz roja *PHYC* y *PHYD* responsables de cierta variación natural. Estos genes colocalizan con QTLs de efecto menor por lo que podrían ser los genes causales de dichos QTLs (Figura 4). A continuación se describen las variantes moleculares naturales identificadas en estos genes de *Arabidopsis* (Tabla 1).

Dos de los genes aislados son *FRI* y *FLC*, localizados en la parte superior de los cromosomas 4 y 5, y que corresponden a los QTLs de efecto mayor responsables de la respuesta diferencial a la vernalización observada en accesiones de ciclo largo y ciclo corto. Como se ha descrito anteriormente, *FRI* y *FLC* han identificado dos genes que no habían sido descritos previamente, como responsables del requerimiento de vernalización de las accesiones de ciclo largo en *Arabidopsis*. El análisis molecular de *FRI* ha revelado que hay dos deleciones diferentes en el primer exón ampliamente distribuidas en poblaciones naturales de *Arabidopsis* de toda Eurasia, y que generan dos alelos de pérdida de función responsables del fenotipo temprano de las accesiones de ciclo corto. Además, se han identificado otras deleciones y varios codones de terminación prematuros menos frecuentes que probablemente se han originado recientemente (Le Corre y col., 2002; Gazzani y col., 2003; Stinchcombe y col., 2004b; Shindo y col., 2005). Por otra parte, el análisis molecular de *FLC* ha permitido identificar tres alelos distintos, muy poco frecuentes, y con niveles de expresión del gen reducidos (Gazzani y col., 2003; Michaels y col., 2003). Dos de estos alelos están originados por inserciones independientes de elementos transponibles (ET) en el primer intrón. Se ha demostrado que los ET son responsables de la reducción de la expresión del gen mediante la metilación de las histonas de esta región (Liu y col., 2004), lo que correlaciona con el fenotipo temprano de las accesiones portadoras. Liu y col., (2004) demostraron que esta metilación está mediada por siRNAs complementarios de la secuencia del ET, y conduce a la formación de una isla de heterocromatina que reduce la expresión de *FLC*. Además se han identificado dos alelos de pérdida de función de *FLC* presentes en una única accesión que son debidos a mutaciones en el sitio aceptor del intrón 6 (accesión Bur-0) y a un codón de terminación prematuro en el exón 6 (accesión Van-0).

Por otro lado, se ha identificado el gen correspondiente al locus *AERIAL ROSETTE1* (*ART1*) situado en el cromosoma 5. Este locus interacciona genéticamente con *FRI* para activar *FLC*, por lo que también está implicado en la regulación de la respuesta de la floración a la vernalización (Poduska y col., 2003). *ART1* corresponde al gen *HUA2* que codifica una proteína involucrada en el procesamiento de RNA (Doyle y col., 2005; Wang y col., 2007). Se han identificado dos alelos naturales con efecto en el tiempo de floración, uno de pérdida y otro de ganancia de función, presentes únicamente en las accesiones *Ler* y *Sy-0*, respectivamente. La accesión de referencia *Ler* es portadora de un alelo con un codón de terminación prematuro,

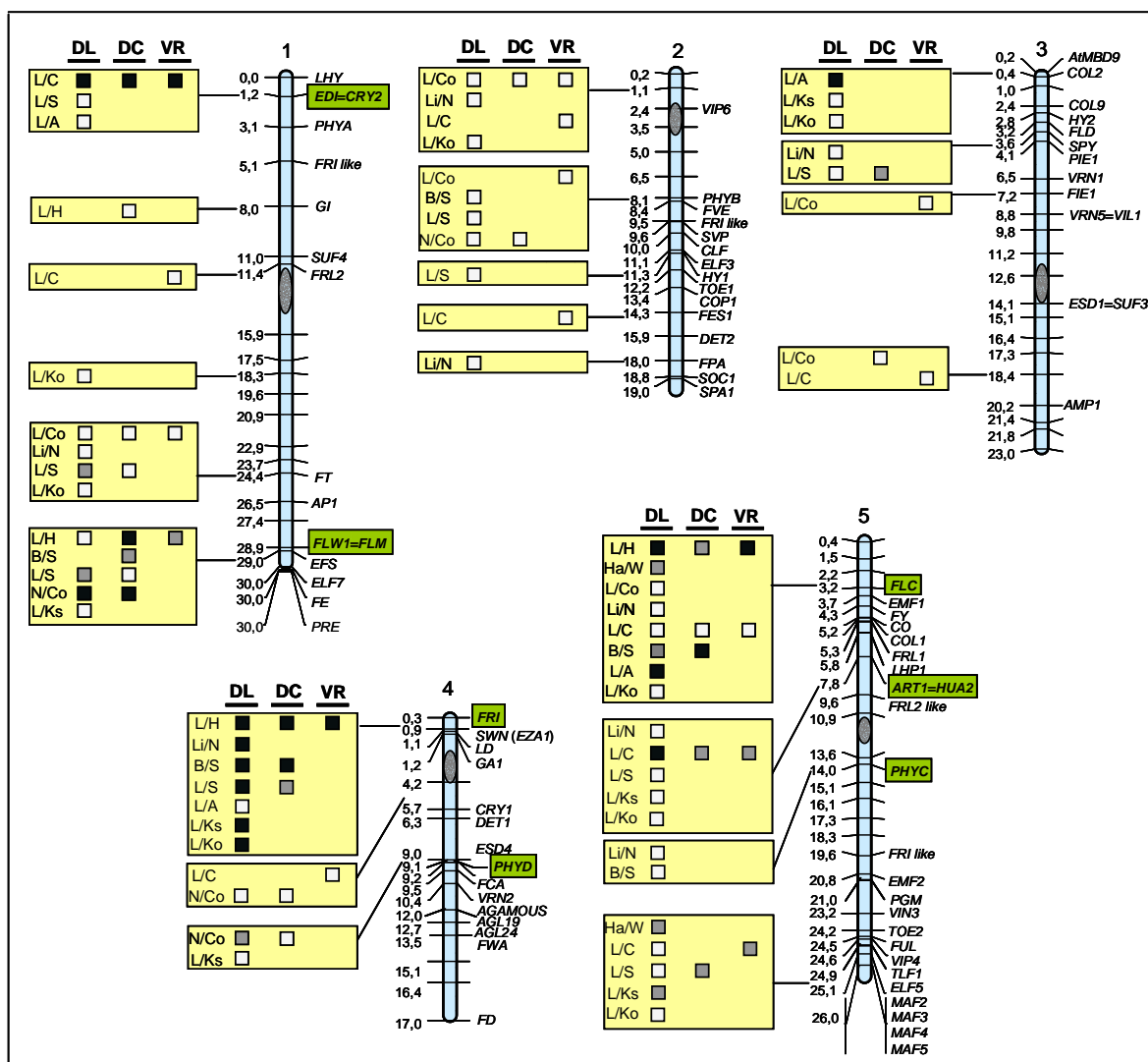


Figura 4. QTLs para el tiempo de floración en arabidopsis.

Las barras azules representan los cinco cromosomas de arabidopsis, cuyas posiciones físicas se indican en Mb. A la izquierda de cada cromosoma se muestran los QTLs identificados en distintas poblaciones experimentales de manera que cada caja contiene los QTLs que colocan en ellas. Cada QTL identificado en una población y un ambiente se representa mediante un cuadrado de diferente color en función del efecto relativo. En negro se representan QTLs que explican más del 20% de la variación fenotípica (QTLs de efecto mayor); en gris aquellos que explican entre el 10% y el 20% (QTLs de efecto moderado) y en blanco los QTLs que explican menos del 10% (QTLs de efecto menor). Los parentales de la población en que se ha identificado cada QTL se indican con las siguientes letras: **L**: Ler; **S**: Shakdara; **A**: Antwerp-1; **Ks**: Kashmir-2; **Ko**: Kondara; **C**: Cvi; **H**: H-51; **Co**: Columbia; **Li**: Limburg-5; **Na**: Naantali; **B**: Bayreuth-0; **N**: Niederzen-1; **Ha**: Hannover Münden; **W**: Wassilewskija. Los QTLs se han identificado en condiciones de fotoperiodo día largo, de día corto y en condiciones de vernalización, tal como se indica en las columnas con las letras **DL**, **DC** y **VR** respectivamente. La floración se cuantificó como el número total de hojas (NTH) o el tiempo de floración (TF), excepto en las poblaciones B/S y N/Co que se midió como el tiempo de aparición del botón floral y en la población L/H que se midió como el número de hojas de roseta. A la derecha de cada cromosoma se muestran los genes identificados mediante análisis de mutantes que participan en la regulación de la floración, mostrándose en cajas verdes los genes identificados como responsables de su variación natural. (**Ha/W**; Kowalski y col., 1994; **L/H**, Clarke y col., 1995; **L/Co**, Jansen y col., 1995; **Li/Na**, Kuittinen y col., 1997; **L/C**, Alonso-Blanco y col., 1998a; **B/S**, Loudet y col., 2002; **L/S**, El-Lithy y col., 2004; **N/Co**, Werner y col., 2005; **L/A**, **L/Ko**, **L/Ks**, El-Lithy y col., 2006)

que da lugar a una proteína truncada que provoca un fenotipo de floración temprano (Doyle y col., 2005). Puesto que este alelo no se ha encontrado en todas las líneas del mismo genotipo de distintos laboratorios, se desconoce si este alelo derivó de una población natural heterogénea para este locus o se ha generado por selección artificial en el laboratorio. Por el contrario, el alelo natural de ganancia de función presente en la accesión Sy-0 retrasa la floración y provoca el desarrollo de rosetas en la parte aérea del tallo (Wang y col., 2007). Se ha propuesto que *HUA2* participa en el procesamiento de RNA de distintos genes tipo MADS box, regulando además de *FLC* a *FLM* que está implicado en la respuesta de floración al fotoperiodo, por lo que *HUA2* también podría participar en esta ruta de la floración.

Por otra parte se han identificado los genes responsables de los QTLs, *EARLY DAY INSENSITIVE* (*EDI*=*CRY2*) y *FLOWERING LOCUS W* (*FLW1*=*FLM*), implicados en la respuesta al fotoperiodo. El locus *EDI* se identificó en el cruzamiento Ler/Cvi debido a que las RILs con el alelo Cvi de *EDI* muestran un fenotipo temprano en día corto. Mediante el mapeo fino de *EDI* en líneas de introgresión y una estrategia de gen candidato se identificó a *CRYPTOCHROME2* (*CRY2*) como el gen responsable del QTL (El-Din El-Assal y col., 2001). El análisis molecular de *CRY2* y experimentos de transgénesis demostraron que Cvi presentaba un alelo único para este gen en el que un cambio aminoacídico produce una ganancia de función al aumentar la estabilidad de la proteína *CRY2* en condiciones de día corto (El-Din El-Assal y col., 2001). Estudios de asociación genética han sugerido la existencia de otros dos alelos de este gen que podrían contribuir a la variación natural en el tiempo de floración (Olsen y col., 2004). Estos autores identificaron mediante secuenciación del gen *CRY2* dos haplotipos de *CRY2* mayoritarios (haplotipos A y B) que difieren en ocho aminoácidos distribuidos en varios de los dominios funcionales de la proteína (**Figura 5**). Además el haplotipo A se divide en los subhaplotipos A^s y A^Q que sólo difieren en un aminoácido del dominio de unión al cromóforo pterina. Por último, el alelo *EDI* es el más temprano y difiere del subhaplotipo A^Q en dos aminoácidos, uno de ellos muy conservado en todas las especies vegetales y localizado en el dominio de unión al cromóforo flavina. Este aminoácido se ha identificado como responsable del efecto extremadamente temprano de floración de *EDI* (El-Assal y col., 2001). Olsen y col. mediante comparación de los tiempos de floración de accesiones portadoras de los distintos haplotipos de *CRY2*, en condiciones de DL y DC, observaron que las accesiones con haplotipo B son las más tempranas seguidas por las de haplotipo A^s y las de haplotipo A^Q que son las más tardías (**Figura 5**).

Haplotipo <i>CRY2</i>	Cambios aminoacídicos			Fenotipo
A ^Q	I Q	D V	T A AFGV Y	<div>Tardío</div> <div>↓</div> <div>Temprano</div>
A ^s	I S	D V	T A AFGV Y	
B	V Q	E V	T G SLE L C	
A ^Q (Cvi) <i>EDI</i>	I Q	D M	I A AFGV Y	
<div><div><div>Pterina</div><div>N-terminal</div><div>Flavina</div><div>C-terminal</div></div><div>81127324367476480505541612</div></div>				

Figura 5. Haplotipos de *CRY2* de las secuencias proteicas de *CRY2*.

La columna de la izquierda muestra los haplotipos de *CRY2* en *arabidopsis* establecidos por Olsen y col. (2004) y la de la derecha el fenotipo diferencial de floración de cada una de ellos. En la secuencia proteica de *CRY2* se muestran los dominios funcionales, así como los cambios aminoacídicos específicos de cada haplotipo indicados por las letras enmarcadas.

El locus *FLW1* se identificó a partir del cruzamiento entre Col-3 y Nd-1, en el que las líneas con el alelo Nd-1 de *FLW1* presentan floración temprana en condiciones de día corto y una reducción de la respuesta al fotoperiodo. Mediante experimentos de hibridación de DNA en microordenamientos de todo el genoma se identificó en Nd-1 una delección de casi 7 Kb que

incluía la secuencia completa del gen *FLM*. Este resultado se corroboró mediante secuenciación y permitió determinar que el alelo de Nd-1 de *FLW1* está presente sólo en esta accesión. *FLM* codifica un factor de transcripción de tipo MADS box y funciona como regulador negativo de la floración (Werner y col., 2005a).

Se han identificado también como responsables de la variación natural para el tiempo de floración algunos de los genes que codifican fotorreceptores de luz roja como *PHYC* y *PHYD* (Aukerman y col., 1997; Balasubramanian y col., 2006a). *PHYC* se ha implicado recientemente en la variación natural mediante análisis de su expresión génica, al detectarse una expresión reducida en la accesión Fr-2 en comparación con Col (Balasubramanian y col., 2006a). El análisis de QTLs en una población segregante derivada del cruzamiento de estas 2 accesiones permitió identificar un alelo de Fr-2 que confiere fenotipo de floración temprano en día corto y que colocaliza con *PHYC*. Este gen presenta un codón de terminación prematuro que sólo se ha encontrado en Fr-2 y que probablemente es el causante de los niveles reducidos de expresión y del fenotipo de floración temprano. El análisis posterior de la secuencia de *PHYC* en 163 accesiones ha mostrado la existencia de dos haplotipos diferenciados en diez aminoácidos. Estudios de asociación de esta variación nucleotídica sugiere que estos haplotipos corresponden a dos alelos naturales con distinto efecto sobre el tiempo de floración. Estos resultados involucran a *PHYC* como regulador negativo de la floración y sugieren que podría participar en la ruta dependiente de fotoperiodo. Por su parte *PHYD* presenta una delección de 14 pb en la accesión Wassilewskija (Ws) que provoca la ausencia de la proteína y un fenotipo débil de floración temprana en luz continua (Aukerman y col., 1997). Además, este alelo natural también se considera un alelo único ya que sólo se ha identificado en esta accesión.

Locus	Función molecular	Polimorfismos funcionales		Alteración funcional	Referencias
		Posición	Mutación		
<i>FRI</i>	Desconocida	promotor exón	delección CTP	Expresión reducida Proteína truncada	Johanson y col., 2000 Le Corre y col., 2002 Shindo y col., 2005
<i>FLC</i>	FTR MADS	primer intrón exón	inserción de ET CTP	Expresión reducida Proteína truncada	Michaels y Amasino, 1999 Michaels y col., 2003 Gazzani y col., 2003 Werner y col., 2005b
<i>EDI=CRY2</i>	Fotorreceptor CRY2	exón	sustitución de aa	Proteína modificada	Lin y col., 1996 El-Assaly col., 2001
<i>FLW1=FLM</i>	FTR MADS	promotor y exón	delección	Expresión reducida	Scortecci y col., 2001 Werner y col., 2005a
<i>PHYC</i>	Fotorreceptor PHYC	exón	sustitución de aa	Proteína truncada	Sharrock y col., 1994 Balasubramanian y col., 2006a
<i>PHYD</i>	Fotorreceptor PHYD	exón	delección	Proteína truncada	Clark y col., 1994 Aukerman y col., 1997
<i>ART1=HUA2</i>	Procesado de RNA	exón	sustitución de aa	Proteína truncada	Doyle y col., 2005 Wang y col., 2007

Tabla 1. Genes de arabidopsis implicados en la variación natural para el tiempo de floración. Para cada gen se muestra el nombre, la función molecular de la proteína que codifica, la posición y el tipo de polimorfismo nucleotídico responsable de la variación del fenotipo de floración y el efecto causado por el polimorfismo funcional. FTR: factor de transcripción, CTP: codón de terminación prematuro, ET: elemento transponible, aa: aminoácido.

Cabe destacar que salvo en el caso de *FRI*, los alelos responsables de los QTLs de efecto mayor aislados hasta la fecha se encuentran en la naturaleza en frecuencias muy bajas. Así, los alelos de pérdida de función de *FLC* descritos se presentan en un número muy reducido de accesiones, por lo que se consideran alelos raros. Además, en los loci de efecto mayor *EDI*, *FLW1* y *PHYC*, el alelo nuevo que en cada locus es responsable del fenotipo de floración sólo se ha identificado en una accesión. De igual forma los dos nuevos alelos naturales identificados en *ART1* y el de *PHYD* están presentes cada uno de ellos en una accesión. De esta forma, el estudio de la base molecular de los QTLs de floración de efecto

mayor, ha identificado mayoritariamente alelos poco frecuentes en las poblaciones de *arabidopsis* analizadas.

Por otra parte, a pesar de la importancia de los QTLs de efecto moderado y menor que explican gran parte de la variación natural para el tiempo de floración, se desconocen por completo sus bases genéticas y moleculares. Así, desconocemos si, al igual que los QTLs de efecto mayor, vienen determinados por el efecto de un único gen, y si el tipo de genes y los polimorfismos funcionales responsables son similares a los encontrados en los QTLs de efecto mayor. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo es la disección genética de QTLs de efecto moderado implicados en el control del tiempo de floración en *arabidopsis*.

5. Bases moleculares de la variación natural para el tiempo de floración en especies cultivadas.

El tiempo de floración es un carácter importante en las especies cultivadas que se ha mejorado genéticamente en muchas variedades a partir de su variación natural. Por ello, la disección genética y molecular de esta variación natural se está abordando en varias de ellas. Hasta la fecha se han analizado molecularmente 15 loci en siete especies que podrían participar en la variación natural (**Tabla 2**), y en 12 de ellos se han identificado conclusivamente las secuencias responsables.

Se han identificado nueve genes diferentes que contribuyen a la variación natural para el tiempo de floración en cinco especies de gramíneas. En arroz, una especie facultativa de día corto que no requiere vernalización se han clonado mediante aproximación posicional los genes responsables de cuatro QTLs, tres de los cuales, *Heading date 1 (Hd1)*, *Heading date 3a (Hd3a)* y *Heading date 6 (Hd6)*, son ortólogos de *CO*, *FT* y *CK2* de *arabidopsis* respectivamente. El cuarto, *Early heading date 1 (Ehd1)*, codifica un regulador de respuesta de tipo B para el que no existe gen ortólogo en *arabidopsis*. Alelos naturales de *Hd1* portadores de una delección de 2 pb que genera un codón de terminación prematuro causan un fenotipo de floración temprano en condiciones de fotoperiodo de día largo y de floración tardía en condiciones de fotoperiodo de día corto. Por ello, *Hd1* reprime la floración en condiciones de fotoperiodo de día largo y la acelera en condiciones de día corto (Yano y col., 2000). Además, se han identificado alelos de floración tempranos causados por la inserción de un elemento transponible que reduce los niveles de expresión del gen *Hd1* (Doi y col., 2004). *Hd3a* es un regulador positivo de la floración en condiciones de día corto ya que alelos naturales portadores de un cambio aminoácido y una delección en la región 3' no transcrita retrasan la floración en estas condiciones. *Hd6* interviene en la sensibilidad al fotoperiodo puesto que alelos funcionales de este gen retrasan la floración en condiciones naturales comparados con alelos que presentan codones de terminación prematuros (Takahashi y col., 2001). *Ehd1*, al igual que *Hd1* y *Hd3a*, regula positivamente la floración en condiciones de día corto, ya que un alelo natural causado por un cambio aminoácido en un dominio esencial para la función de la proteína produce un fenotipo de floración tardío en dichas condiciones (Doi y col., 2004).

A diferencia del arroz, el trigo y la cebada muestran variación en su requerimiento de vernalización lo que permite distinguir, como en *arabidopsis*, variedades de invierno y variedades de primavera. Se han identificado tres genes clave, *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, *VERNALIZATION 2 (VRN2)* y *VERNALIZATION 3 (VRN3)*, que interaccionan y son responsables de la respuesta a la vernalización. *VRN2* codifica para un factor de transcripción relacionado con la familia de proteínas de tipo CO (contiene un dominio CCT) y es un regulador negativo de la floración, cuya expresión se reduce como consecuencia de la vernalización (Yan y col., 2004a). Mutaciones en el dominio CCT o delecciones del gen completo *VRN2* en trigo diploide (*T. monococcum*) y en cebada (*H. vulgare*) confieren un fenotipo de floración temprana y pérdida del requerimiento de vernalización, un fenotipo característico de las variedades de primavera. *VRN1* codifica un factor de transcripción de tipo MADS ortólogo del gen de identidad del meristemo floral *AP1* de *arabidopsis*. Se trata de un regulador positivo de la floración cuya expresión se induce por vernalización en genotipos de invierno tanto de trigos (*T. monococcum* y

T. aestivum) como de cebada (Yan y col., 2003; Yan y col., 2004b; Fu y col., 2005; Szűcs y col., 2007). Se ha demostrado que *VRN2* regula negativamente la expresión de *VRN1*, y que la variación alélica de *VRN2* tiene poco o ningún efecto sobre el tiempo de floración en variedades de primavera de trigo y cebada portadoras de mutaciones en el promotor o primer intrón de *VRN1* que provocan su expresión constitutiva. Esto explica la interacción genética observada clásicamente entre los loci *VRN1* y *VRN2* de trigo y cebada. Además, recientemente se ha demostrado que la longitud del intrón de *VRN1* (determinada por una delección de longitud variable) podría estar relacionada con el gradiente cuantitativo de la respuesta a la vernalización en distintos genotipos de cebada (Szűcs y col., 2007). *VRN3* se ha identificado recientemente mediante mapeo de QTLs en trigo blando (*VRN-B3*) y en cebada (*VRN-H3*) como responsable parcial de las diferencias en la respuesta a la vernalización entre las variedades de invierno y las de primavera (Yan y col., 2006). Los mapeos finos de *VRN-B3* y *VRN-H3* utilizando marcadores moleculares de arroz y trigo silvestre (*Aegilops tauschii*) combinados con análisis de expresión génica y complementación en plantas transgénicas han demostrado que en ambas especies el gen responsable es ortólogo del regulador positivo de la floración *FT* de *arabidopsis* (*TaFT* y *HvFT1* de trigo y cebada respectivamente). Se ha mostrado que las plantas homocigóticas para el alelo *TaFT* portadoras de una inserción de un retrotransposón en la región promotora florecen antes que plantas sin esta inserción y que dos polimorfismos de tipo SNP localizados en el primer intrón del gen *HvFT1* también están asociados con el hábito de primavera (Yan y col., 2006). Además, se ha demostrado que la vernalización induce la expresión de *HvFT1* en las variedades de invierno, al igual que se induce por fotoperiodo de día largo tanto en variedades de invierno como de primavera (Yan y col., 2006).

En cebada, una especie facultativa de día largo, se han identificado otros dos loci, *Photoperiod-H1* (*Ppd-H1*) y *Photoperiod-H2* (*Ppd-H2*), implicados en la variación natural para la respuesta de floración al fotoperiodo. El gen *Ppd-H1* codifica el regulador de pseudo- respuesta (*PRR*) ortólogo del gen de *arabidopsis* *PRR7* implicado en la regulación de la floración por el reloj circadiano. Los genes *PRR* se caracterizan por presentar el dominio CCT presente en genes de la familia de CO y en *VRN2*. El análisis molecular de *Ppd-H1* en variedades de invierno y primavera ha identificado dos alelos polimórficos para un INDEL y siete cambios aminoacídicos. Una de estas sustituciones aminoacídicas se localiza en una región altamente conservada del dominio CCT, lo que sugiere que es el polimorfismo responsable de las diferencias de floración causadas por este gen (Turner y col., 2005). Recientemente también se ha sugerido que el gen *HvFT3* de cebada (ortólogo del gen *FT* de *arabidopsis*) es *Ppd-H2* ya que colocaliza con este QTL. Las variedades de invierno tienen parte del gen *HvFT3* deletado lo que correlaciona con los niveles de expresión reducidos del gen y con un fenotipo de floración tardío (Faure y col., 2007). No obstante la demostración conclusiva de su identificación requiere análisis funcionales más detallados.

En maíz, a pesar de haberse identificado más de 60 QTLs diferentes para el tiempo de floración en más de 22 cruzamientos (Chardon y col., 2004) sólo se ha clonado conclusivamente el locus *Vgt1*. *Vgt1* se ha delimitado mediante mapeo fino a una región no codificante de 2 Kb, conservada en los genomas de arroz, sorgo y maíz (Salvi y col., 2007). Esta región contiene polimorfismos funcionales que podrían regular diferencialmente la expresión de un gen adyacente que es ortólogo de *AP2* de *arabidopsis*, implicado en el tiempo de floración (Salvi y col., 2007). Además, se ha encontrado asociación entre la variación nucleotídica natural del gen *Dwarf8* (ortólogo del gen *GAI* de *arabidopsis*) y la variación para el tiempo de floración (Thornsberry y col., 2001; Camus-Kulandaivelu y col., 2006).

En *Brassica rapa* y *Brassica nigra*, dos especies de la misma familia que *arabidopsis*, el mapeo de QTLs de floración junto con análisis de expresión y de asociación genética han permitido identificar genes homólogos a los de *arabidopsis* como candidatos para algunos de los QTL identificados. En *Brassica rapa*, los genes *BrFLC1* y *BrFLC2* se han asociado a la variación fenotípica para este carácter (Kole y col., 2001) y su expresión correlaciona con el tiempo de floración, lo que sugiere que participan en la regulación de la floración por

vernalización de forma similar a como se ha descrito en *arabidopsis* (Schranz y col., 2002). En *Brassica nigra*, dos genes homólogos al gen *CO* de *arabidopsis*, *BniCO* y *BniCOL1*, podrían estar implicados en la variación para el tiempo de floración. Estudios de asociación con *BniCOL1* han mostrado que un INDEL de 18 pb está relacionado con las diferencias observadas en el tiempo de floración (Österberg y col., 2002). No obstante, no se ha demostrado experimentalmente la implicación de estos genes en la variación natural para el inicio de la floración de estas especies.

Por último, en otras especies se ha sugerido la implicación de genes como *PHYB* y *FT* en la variación natural para caracteres relacionados con la floración, bien mediante análisis de asociación, o colocación con QTLs (Sawers y col., 2005; Roux y col., 2006). En *Populus tremula*, análisis moleculares han mostrado asociación entre la secuencia del gen *PHYTOCHROME B2* (*PHYB2*) y el tiempo de brotación de las yemas, sugiriendo un gradiente latitudinal de adaptación de poblaciones naturales a las distintas condiciones locales de fotoperiodo (Ingvarsson y col., 2006). Además, *PHYB2* colocaliza con un QTL de tiempo de floración en una población segregante del cruzamiento entre dos especies de tomate (Jiménez-Gómez y col., 2007). En abeto (*Picea abies*) se ha propuesto que la expresión de un gen ortólogo a *FT* de *arabidopsis* podría estar asociada a la variación en el inicio de la brotación de las yemas entre dos poblaciones expuestas a distintas condiciones de fotoperiodo (Gyllenstrand y col., 2007).

Especie	Locus	Función molecular	Polimorfismos funcionales		Alteración funcional	Referencias
			Posición	Mutación		
<i>Oriza sativa</i>	<i>Hd1</i>	FTR CO like	exón	delección (2 bp)	Proteína truncada	Yan y col., 2000
	<i>Hd3a</i>	Proteína FT like	-	inserción de ET	Expresión elevada	Dai y col., 2004
	<i>Hd6</i>	Proteína quinasa CK2	exón	-	Expresión elevada	Kojima y col., 2002
	<i>Ehd1</i>	Regulador de respuesta	exón	sustitución de aa	Proteína alterada	Takahashi y col., 2001
<i>Triticum monococcum</i>	<i>VRN1</i>	FTR MADS AP-1 like	promotor	delección	Expresión elevada	Yan y col., 2003
	<i>VRN2</i>	ZCCT1 (FTR relacionado con CO)	promotor y exón	sustitución de aa	Proteína alterada	Yan y col., 2004a
<i>Triticum aestivum</i>	<i>VRN1</i>	FTR MADS AP-1 like	promotor e intrón	delección, inserción	Expresión elevada	Yan y col., 2004b
	<i>VRN3</i>	Proteína FT like	promotor	inserción de ET (5,3 Kb)	Expresión elevada	Yan y col., 2006
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>VRN1</i>	FTR MADS AP-1 like	promotor e intrón	delección, inserción	Expresión elevada	Fun y col., 2005
	<i>VRN2</i>	ZCCT1 (FTR relacionado con CO)	promotor y exón	delección grande	Expresión nula	Szűcs y col., 2007
	<i>Ppd-H1</i>	PRR (dominio CCT relacionado con CO)	exón	sustitución de aa	Proteína modificada	Yan y col., 2004a
	<i>VRN3</i>	Proteína FT like	primer intrón	2 SNPs ligados	Expresión elevada	Turner y col., 2005
	<i>Ppd-H2</i>	Proteína FT like	-	delección grande	-	Yan y col., 2006
<i>Zea mays</i>	<i>dwarf8</i>	FTR GAI like putativo	promotor y exón	inserción, delección	-	Thornberry y col., 2001
	<i>Vgt1</i>	Secuencia reguladora intergénica	no codificante	2 SNPs ligados y 1 ET	-	Salvi y col., 2007
<i>Brassica rapa</i>	<i>BrFLC1</i> y <i>BrFLC2</i>	FTR MADS	-	-	-	Kole y col., 2001
<i>Brassica nigra</i>	<i>BniCOa</i> o <i>BniCOL1</i>	FTR CO like	-	-	-	Schranz y col., 2002

Tabla 2. Genes implicados en la variación natural para el tiempo de floración en plantas cultivadas. Para cada gen se muestra la especie, su nombre, la función molecular de la proteína que codifican, la posición, el tipo de polimorfismo responsable de la variación del fenotipo de floración y el efecto causado por el polimorfismo funcional. FTR: factor de transcripción, FR: fotorreceptor, CTP: codón de terminación prematuro, ET: elemento transponible, aa: aminoácido, SNP: polimorfismo de un nucleótido ("Single Nucleotide Polymorphism").

El análisis de los QTLs de floración está permitiendo identificar los genes que en cada especie son responsables de la variación natural intraespecífica y que podrían estar implicados en la adaptación a distintos ambientes. La comparación de los QTLs aislados molecularmente entre especies, determina si los genes responsables de la variación natural para el inicio de la floración son los mismos en diferentes especies. Así se ha observado que algunos de los genes responsables de la variación natural son los mismos en especies filogenéticamente relacionadas, como es el caso de *FLC* en *Brassicaceas* y *VRN* en *Triticineas*. Sin embargo, la comparación de especies filogenéticamente alejadas indica que diferentes genes presentan funciones análogas en distintas especies como es el caso de los genes *FLC* de *arabidopsis* y *VRN2* de trigo. En la mayor parte de los casos, los genes responsables de la variación natural para el inicio de la floración son diferentes en especies no relacionadas, lo que sugiere que los mecanismos de adaptación a distintos ambientes están condicionados por el fondo genético y la historia evolutiva de cada grupo taxonómico. No obstante, el número de loci identificados hasta la fecha en cada especie es muy pequeño y en todos los casos se trata de QTLs de efecto mayor, que como se ha descrito para *arabidopsis*, representan una fracción minoritaria de los alelos naturales implicados. Por ello es necesario el análisis de un mayor número de loci, con comportamientos genéticos diferentes, para profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que determinan la variación natural para el control del inicio de la floración.

6. Antecedentes del presente trabajo

En nuestro laboratorio estamos interesados en identificar las bases genéticas y moleculares de la variación natural para el tiempo de floración en *arabidopsis*. En particular estamos interesados en la respuesta a la vernalización, ya que es una de las respuestas adaptativas más ampliamente distribuida en las plantas y que implica diferentes genes en distintas especies. Además, su variación natural en *arabidopsis* ha sido el principal recurso genético con el que se están determinando las bases moleculares de este proceso. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha identificado la accesión Llagostera-0 (LI-0) caracterizada por presentar mayor respuesta a la vernalización que la cepa de referencia *Ler*.

Por otro lado, por las razones descritas anteriormente, estamos interesados en la disección genética de QTLs de floración de efecto moderado, ya que hasta la fecha no se conocen las bases genéticas y moleculares de ninguno de ellos. Para abordar su estudio, en los años previos a este trabajo se han desarrollado 3 poblaciones de líneas de introgresión cuasi-isogénicas portadoras de alelos tempranos de efecto pequeño procedentes de las accesiones C24, Richmond-0 (Ri-0) y Shakdara (Shak) en fondo genético *Ler*. Estas líneas se obtuvieron mediante cuatro generaciones de retrocruzamiento con *Ler*, en las que se seleccionaron líneas con fenotipos extremos de floración temprana. Posteriormente, estas líneas se genotiparon con marcadores moleculares a lo largo de todo el genoma, lo que ha permitido identificar dos regiones genómicas portadoras de alelos tempranos de estas accesiones denominadas *Flowering arabidopsis QTL2 (FAQ2)* y *Flowering arabidopsis QTL3 (FAQ3)*. *FAQ2* se localiza en la región superior del cromosoma 1 y se dispone de líneas de introgresión cuasi-isogénicas de esta región procedentes de C24, Shak y Ri-0. *FAQ3* se localiza en la región superior del cromosoma 3 y se dispone de líneas de introgresión de esta región que proceden de Shak.

II.OBJETIVOS

Objetivos:

En este trabajo nos propusimos dos objetivos generales derivados de los antecedentes descritos. Por un lado, determinar las bases genéticas de la mayor respuesta a la vernalización de la accesión LI-0. En particular, este estudio se propone identificar el posible papel de otros loci distintos de *FRI* y *FLC* en esta accesión. Por otro lado, caracterizar y diseccionar los QTLs *FAQ2* y *FAQ3*, para conocer la estructura de QTLs de efecto menor que es prácticamente desconocida. Estos dos objetivos generales se concretan en los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción de una población de líneas recombinantes consanguíneas entre las accesiones Landsberg *erecta* (Ler) y Llagostera-0 (LI-0) y elaboración de su mapa genético.
2. Disección genética de la variación para el tiempo de floración en respuesta a la vernalización mediante el mapeo de QTLs en la población de líneas recombinantes derivadas del cruzamiento Ler x LI-0.
3. Caracterización genética del locus *FAQ3*, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos.
4. Caracterización genética de los alelos C24, Shakdara (Shak) y Richmond-0 (Ri-0) del locus *FAQ2*, mapeo fino del locus y búsqueda de genes candidatos.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

La mayor parte del material vegetal utilizado en este trabajo se desarrolló en el fondo genético Landsberg *erecta* (Ler) de *Arabidopsis thaliana*. La cepa Ler, original de Polonia (Rédei, 1992) es una de las más utilizadas en los laboratorios y es portadora de la mutación morfológica recesiva *erecta*. Esta mutación es responsable de una morfología más compacta y permite detectar posibles contaminaciones en poblaciones derivadas de cruzamientos con Ler.

1.1 Población de RILs Ler/LI-0

Para construir la población de líneas recombinantes consanguíneas (RILs por Recombinant Inbred Lines) se utilizó Ler como parental femenino y la accesión Llagostera-0 (LI-0) como parental masculino. LI-0 procede del Nordeste de España (Latitud N42°, Longitud E3°, Altitud 300 m.) y se obtuvo del Nottingham Arabidopsis Stock Center (referencia N1338).

La población de RILs Ler/LI-0 se construyó mediante el método del descendiente de una única semilla (SSD por Single Seed Descent) durante ocho generaciones de autofecundación tal como se describe a continuación. Tras el cruzamiento Ler x LI-0 una única planta F₁ se autofecundó para obtener una población F₂ de 148 plantas y cada una de ellas se autofecundó de nuevo. Se cultivaron doce plantas F₃ para obtener la siguiente generación F₄. Con el objeto de minimizar la selección artificial de las plantas que daban lugar a la siguiente generación, de cada planta F₂ se sembraron 12 semillas F₃ en dos alveolos (6 por alveolo) de 5 x 5 x 5 cm y se cosechó el individuo más cercano a la esquina superior derecha de cada alveolo. La planta del primero de los alveolos se utilizó para obtener la próxima generación F₄ excepto en los pocos casos en que ésta murió o fue estéril, en que se utilizó la planta del segundo alveolo. Este proceso se repitió hasta alcanzar la generación F₈. Posteriormente, para multiplicar la población se sembraron 20 semillas F₉ de cada línea F₈ en macetas de 8 x 8 x 8 cm y se cosecharon conjuntamente las plantas de cada línea (semilla F₁₀). Las semillas F₁₀ de las líneas constituyen la población permanente de RILs Ler/LI-0 (ver **Resultados**).

1.2 Líneas de introgresión FAQ3

En la mendelización de FAQ3 se utilizaron tres líneas de introgresión cuasi-isogénicas (LS5, LS11 y LS22) de floración temprana derivadas del cruzamiento entre Ler y Shakdara (Shak, S) (**Figura 6**). Estas líneas habían sido genotipadas previamente con 116 marcadores moleculares de tipo AFLPs, microsatélites e INDELs y para la mayoría de estos marcadores presentaron el alelo Ler, (un 70% en la línea LS5, un 85% en la línea LS11 y un 89% en la línea LS22). Dado que las tres líneas eran portadoras de alelos Shakdara en varias regiones genómicas, cada una de ellas se cruzó con Ler y tras la autofecundación de las distintas F₁ se obtuvieron poblaciones F₂ segregantes. Estas poblaciones se analizaron con marcadores moleculares de las regiones implicadas y se seleccionaron las líneas con una única introgresión Shak en la región FAQ3 LS5-321, LS11-107 y LS22-703 (**Figura 6**). Las dos primeras líneas portaban alelos FAQ3-Shak en homocigosis y se utilizaron en la caracterización del efecto de FAQ3 en el inicio de la floración. Para realizar el mapeo fino se obtuvieron líneas con fragmentos de introgresión menores (denominadas líneas de mini-introgresión, ver **Resultados**) a partir del genotipado de la población F₂ de 207 plantas obtenidas por autofecundación de la planta LS22-703 (heterocigótica para la región FAQ3) con marcadores moleculares.

1.3 Líneas de introgresión FAQ2

Para la mendelización de FAQ2 se utilizaron las líneas de introgresión cuasi-isogénicas LC7, LR12 y LS5 de floración temprana derivadas del cruzamiento entre Ler y las accesiones C24 (C), Richmond-0 (Ri-0, R) y Shakdara (Shak, S) respectivamente (**Figura 7**). Estas tres líneas habían sido genotipadas previamente con 94, 137 y 116 marcadores moleculares de tipo AFLPs, microsatélites e INDELs y para la mayor parte de ellos presentaron el alelo Ler (un 90% en la línea LC7, un 85% en la línea LR12 y un 70% en la línea LS5). La introgresión del cromosoma 1

de la línea LS5 es la mayor de las tres, con un tamaño de unas 6,5 Mb mientras que en las líneas LC7 y LR12 es de cerca de 6 Mb. De la misma forma que para *FAQ3*, las líneas LR12 y LS5 se cruzaron con *Ler* para obtener líneas portadoras de una única introgresión en la región *FAQ2*. La línea LC7 se autofecundó debido a que llevaba sólo otra introgresión en heterocigosis. Las poblaciones segregantes de cada línea se analizaron con marcadores moleculares de las regiones implicadas y se seleccionaron las plantas portadoras de esta región en homocigosis (LC7-1 y LR12-231) o en heterocigosis (LR12-312 y LS5-239) (**Figura 7**).

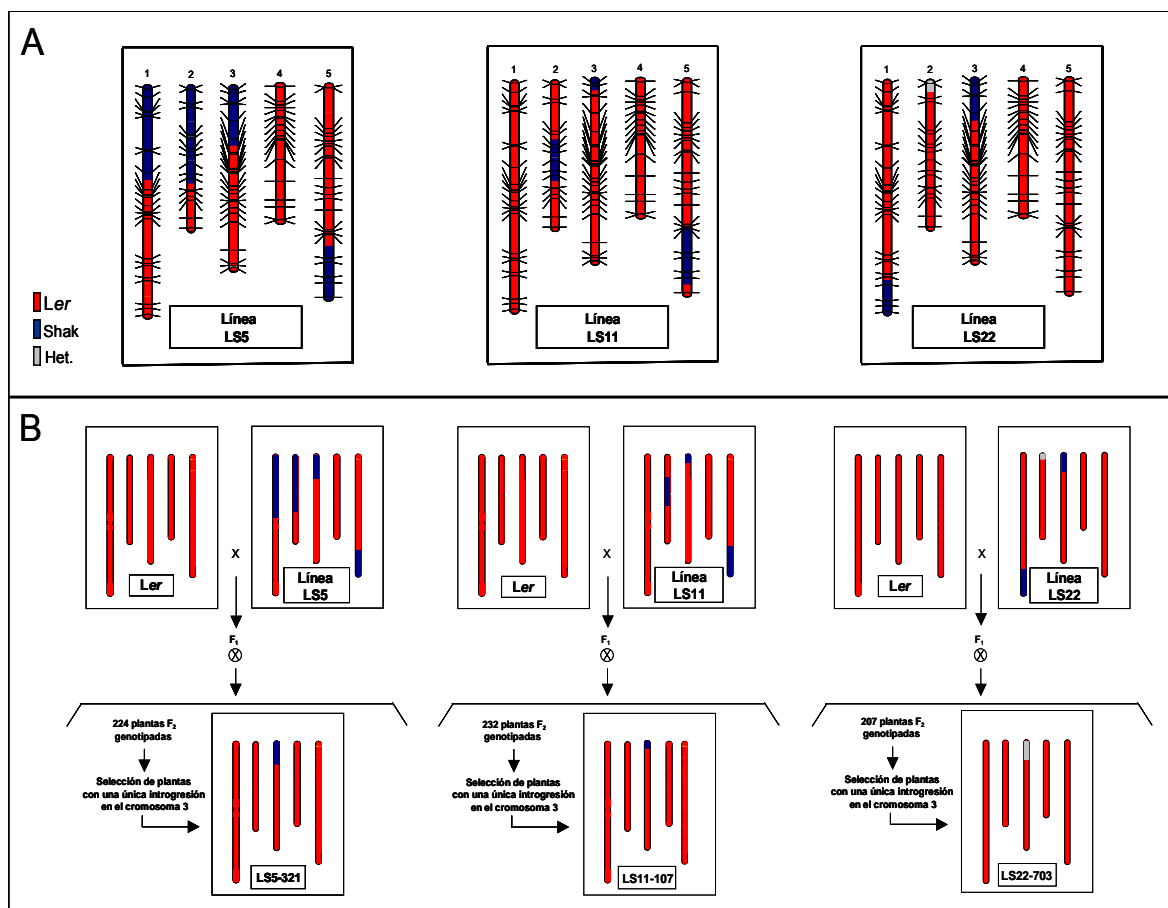


Figura 6. Material vegetal y diseño experimental para la mendelización de *FAQ3*. **A.** Genotipos gráficos de las tres líneas de introgresión *Ler* x *Shak* de partida. **B.** Procedimiento de mendelización de la región *FAQ3*. Las barras representan cada uno de los cinco cromosomas de *Arabidopsis*. En color rojo se muestran las regiones cromosómicas de origen *Ler*, en color azul las regiones cromosómicas *Shak* y en gris las regiones en heterocigosis. Las líneas horizontales representan la posición de los marcadores moleculares utilizados en el genotipado de las líneas de introgresión de partida.

Las dos líneas homocigóticas se utilizaron en la caracterización del efecto de *FAQ2*-C24 y *FAQ2*-Ri-0 en el inicio de la floración. Para la caracterización de *FAQ2*-*Shak* se utilizó la línea LS5-239-21 homocigota para *FAQ2*-*Shak*, que se obtuvo a partir de la descendencia por autofecundación de la línea LS5-239. Para el mapeo fino de *FAQ2* se obtuvieron líneas de mini-introgresión en las regiones *FAQ2* (**Figuras 33, 34 y 35 de Resultados**) a partir de las poblaciones segregantes para *FAQ2* de distinto origen (C24, Ri-0 y *Shak*). Para caracterizar el efecto de *FAQ2*-C24 en la longitud del hipocótilo, se analizaron 7 líneas de mini-introgresión y se utilizaron como controles los mutantes *cry2-1* (Guo y col., 1998), *phyB-1* (Koornneef y col., 1980) y *phyA-201* (Nagatani y col., 1993) en fondo genético *Ler*.

2. Condiciones de cultivo de las plantas

Las semillas se sembraron en placas Petri desechables sobre papel de filtro empapado en agua destilada y se incubaron en una cámara fría (4°C), durante cuatro días para promover una

germinación homogénea. Posteriormente, se transfirieron a una cámara climatizada (22°C, 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad), donde se incubaron durante cuatro días más. Las plántulas germinadas se plantaron en bandejas de 28 alveolos de 5 x 5 x 5 cm o en tiestos de 8 x 8 x 8 cm conteniendo mezcla de compost y vermiculita en proporción 3:1. Las plantas se cultivaron a una densidad de seis plantas por alveolo.

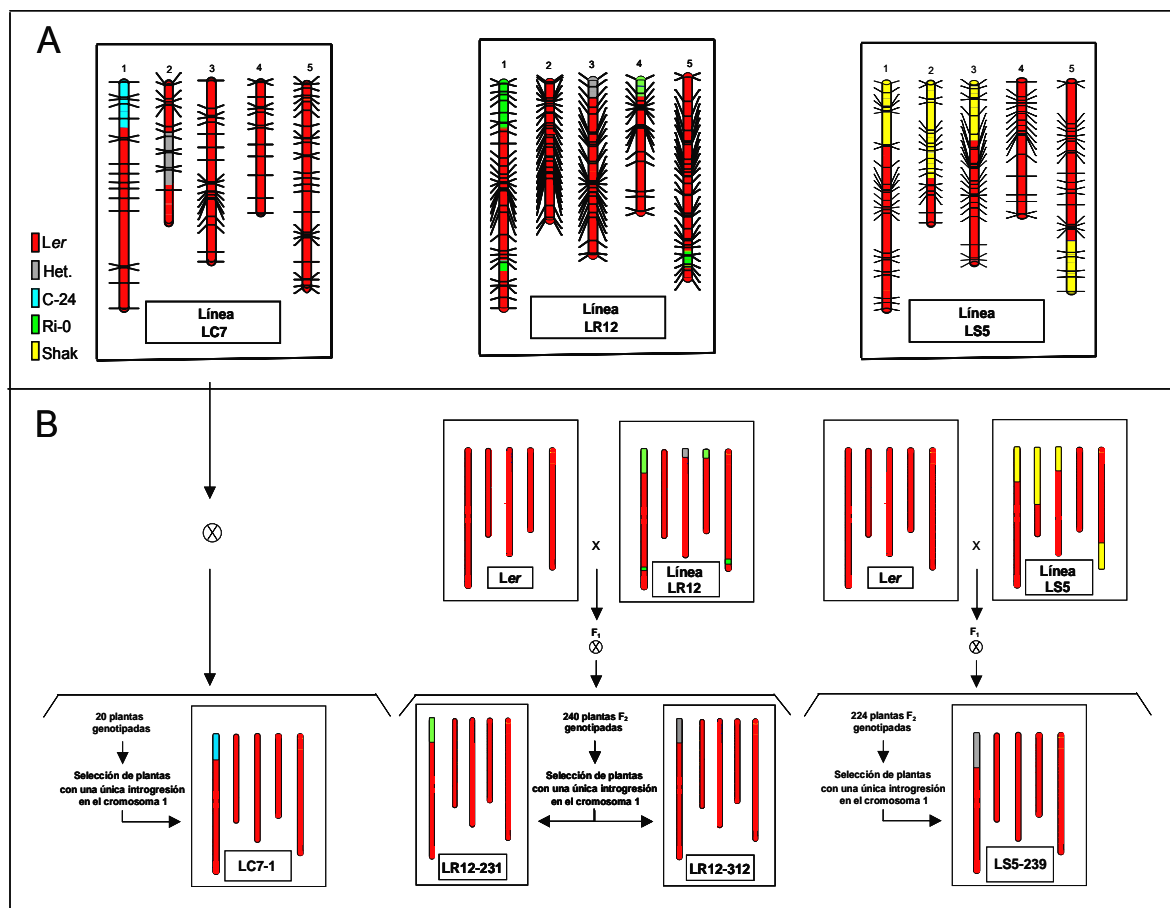


Figura 7. Material vegetal y diseño experimental para la mendelización y caracterización de FAQ2.

A. Genotipos gráficos de las tres líneas de introgresión de partida, derivadas de cruzamientos entre Ler y las accesiones C24, Ri-0 y Shak. **B.** Procedimiento de mendelización de la región FAQ2. La línea LC7 se autofecundó (⊗) para obtener directamente líneas homocigóticas para la región FAQ2-C24. Las líneas LR12 y LS5 se cruzaron con Ler y se seleccionaron en poblaciones F₂ las correspondientes líneas de introgresión FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak. Las barras representan cada uno de los cinco cromosomas de *Arabidopsis*. En color rojo se muestran las regiones cromosómicas de origen Ler, en azul las regiones cromosómicas C24, en verde las regiones cromosómicas Ri-0, en amarillo las regiones cromosómicas Shak y en gris se muestran las regiones en heterocigosis. Las líneas horizontales representan la posición de los marcadores moleculares utilizados en el genotipado de las líneas de introgresión de partida.

2.1 Fotoperíodo

La mayoría de los experimentos se realizaron en condiciones de fotoperíodo de día largo (16 horas luz / 8 horas oscuridad) para lo que las plantas se cultivaron en un invernadero a una temperatura de 22°C con suplemento de luz incandescente durante 16 horas. Las condiciones de fotoperíodo de día corto (8 horas de luz / 16 horas de oscuridad) se proporcionaron en cámaras de ambiente controlado a 22°C.

Para realizar los análisis fenotípicos de las líneas de mini-introgresión y la caracterización de la respuesta a la vernalización de Ler y LI-0, se cultivaron los genotipos analizados en cada experimento en 1-3 bloques aleatorios con 1 a 4 alveolos por genotipo y seis plantas por alveolo.

2.2 Vernalización

Para proporcionar los tratamientos de vernalización en día largo y en día corto (VDL y VDC respectivamente) a las RILs se usaron dos cámaras frigoríficas (5°C) dotadas de 2 fluorescentes por cámara (Arévalo, Sevilla, España). El fotoperiodo durante la vernalización fue de 18:6 luz: oscuridad (VDL) y de 6:18 (VDC). Con el fin de no introducir variables adicionales que pudieran interferir en el experimento, la estratificación a 5°C y la inducción de la germinación a 20°C, se llevaron a cabo durante 4 días en las mismas condiciones de fotoperiodo que durante la vernalización. Tras este periodo las plántulas de cada RIL y de cada parental se plantaron en bandejas de 28 alveolos que contenían la mezcla de sustrato y vermiculita. Estas bandejas se colocaron en las cámaras de vernalización (5°C) en día largo (VDL) y en día corto (VDC) durante tres meses. En cada ambiente de vernalización se diseñaron dos bloques aleatorios con un alveolo con seis plantas por genotipo. Para evitar efectos de posición dentro de las cámaras de vernalización, las bandejas se cambiaron de posición cada semana siguiendo siempre el mismo orden. Transcurridos los 3 meses de vernalización las bandejas con las RILs se transfirieron a un invernadero bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, 22°C).

Para analizar el comportamiento de floración de la población de RILs sin vernalización (NV), la población y los parentales se plantaron al lado de los bloques vernalizados tres días después de finalizar los tratamientos de frío para que estuvieran todas las plantas en el mismo estado fenológico. El tratamiento NV se organizó en 4 bloques aleatorios de dos alveolos con 6 plantas por alveolo cada uno.

2.3 Calidad de la luz

El efecto de *FAQ2-C24* sobre la longitud del hipocótilo se analizó en siete líneas de mini-introgresión en tres tipos de luz continua monocromática (roja, infrarroja y azul) y tres intensidades (alta, media y baja) en cada una. Para ello se utilizó una cámara Percival E-30LEDL3 (Percival Scientific Inc., LA, USA) donde se cultivaron las plántulas durante una semana a una temperatura de 21°C. En cada una de las 3 longitudes de onda seleccionadas se utilizó un mutante de un fotorreceptor que sirvió de control. En luz roja se analizó el mutante del *phyB-1* (Koornneef y col., 1980), en luz infrarroja el mutante *phyA-201* (Nagatani y col., 1993) y en luz azul el mutante *cry2-1* (Guo y col., 1998). Las tres intensidades elegidas para cada luz se establecieron a partir de experimentos previos llevados a cabo en la misma cámara por el laboratorio del Dr. Jarillo (Madrid, INIA). En luz roja los genotipos se expusieron a intensidades de 0,2 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 7,2 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y 30 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. En luz infrarroja las intensidades fueron 0,1 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y 50 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y en luz azul 0,62 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 8,62 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y 20 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. En cada longitud de onda se analizaron simultáneamente las tres intensidades indicadas para cada una de las luces. En cada intensidad se analizaron tres replicas (placas) que contenían 16 semillas por genotipo. En cada uno de los tres experimentos se expusieron dentro de la propia cámara otras tres replicas (placas) con los mismos genotipos en oscuridad total. Para ello las placas se introdujeron en bolsas negras y colocadas dentro de una caja opaca. Paralelamente otras tres placas con los mismos genotipos fueron expuestas a luz blanca en una cámara de ambiente controlado a 22°C y fotoperiodo de DL (16 horas de luz: 8 de oscuridad).

Los distintos genotipos (**Figuras 41, 42 y 43 de Resultados**) se sembraron en placas Petri desechables que contenían medio 0,5X MS (Duchefa, Holanda) y 0,8% agar divididas en nueve sectores de igual tamaño. Previamente las semillas se esterilizaron en una solución de esterilización (20% lejía; 80% etanol absoluto) durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur ultrafina acoplada a una bomba de vacío. Después se lavaron dos veces con 1 mL de etanol absoluto durante cinco minutos. Finalmente las semillas se secaron durante toda la noche en una campana de flujo laminar donde se procedió a la siembra. Los bordes de las placas se sellaron con cinta aislante negra para evitar su apertura y contaminación luminosa. Con el propósito de evitar la exposición a la luz antes de los distintos tratamientos las placas se guardaron en el interior de una bolsa negra y ésta dentro de una

caja opaca que se colocó en una cámara fría a 4°C durante 4 días para promover la germinación homogénea. Después de finalizar el tratamiento de frío y antes de iniciar el tratamiento de luz monocromática continua en la cámara, la germinación fue inducida mediante la exposición de las placas a luz blanca durante dos horas a 22°C.

3. Análisis fenotípicos

3.1 Cuantificación del tiempo de floración

El inicio de la floración se cuantificó mediante medidas de tiempo y de número de hojas ya que ambos parámetros están altamente correlacionados (Koornneef y col., 1991). Para medir el tiempo se utilizaron dos variables: el tiempo de floración propiamente dicho (TF) y el tiempo de aparición del botón floral (TABF). El TF es el número de días transcurridos desde el día de la plantación hasta la apertura de la primera flor. Este valor incluye tanto el tiempo de inducción floral como el de desarrollo de la inflorescencia. Para una mayor precisión en la medida del tiempo de floración, se cuantificó también el TABF como el tiempo transcurrido hasta la detección macroscópica del botón floral. El número de hojas se cuantificó mediante 3 variables: el NHR que es el número de hojas de la roseta principal exceptuando los cotiledones; el NHC que es el número de hojas caulinares del tallo principal al abrirse la primera flor, y el número total de hojas (NTH) que resulta de la suma de las dos variables anteriores. En la población de RILs se analizó también la variable derivada del TF y del NTH definida como la razón entre ambas (TF/NTH) y que describe el tiempo medio (en días) que la planta tarda en desarrollar una hoja.

3.2 Medida de la longitud del hipocótilo

Para medir la longitud del hipocótilo, las plántulas se transfirieron a placas desechables de 12 x 12 cm de agar al 1% procurando que las plántulas quedasen rectas sobre el agar y perpendiculares a una línea horizontal recta dibujada sobre la placa. Para cada una de las distintas condiciones analizadas y cada replica se utilizó una placa rotulada previamente sobre la que se transfirieron las 10 plántulas de cada genotipo con el hipocótilo más largo y la placa se fotografió con una cámara digital. La longitud del hipocótilo de cada plántula se midió en mm sobre la imagen obtenida utilizando el programa Image Tool v3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Para cada genotipo se calculó el valor fenotípico medio correspondiente de las 10 plántulas. A partir de las longitudes absolutas se estimaron las longitudes relativas del hipocótilo de cada una de las líneas que sirvieron para determinar la inhibición de la elongación del hipocótilo por luz. Para ello cada una de las medias de replica de cada genotipo se dividió por la media de las replicas en oscuridad y se multiplicó por 100 ($\text{Longitud Hipocótilo}_{\text{luz}} \times 100 / \text{Longitud Hipocótilo}_{\text{oscuridad}}$). Estos valores se calcularon para cada una de las intensidades de luz monocromática y para las plántulas cultivadas en luz blanca.

4. Análisis genotípicos

4.1 Extracción de DNA

El DNA de cada RIL Ler/LI-0 se extrajo a partir de 2-3 hojas jóvenes de la roseta y de la cabeza floral de una única planta. Inmediatamente tras su recolección este material se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta el momento de la extracción según el protocolo de Bernatzky y Tanksley (1986) con ligeras modificaciones. El material congelado se molió en un mortero con nitrógeno líquido y el polvo se transfirió a un tubo que contenía 480 µL de tampón de extracción (0.1 M Tris, pH 7.5; 0.35 M Sorbitol; 5 mM EDTA). Después se añadieron 480 µL de tampón de lisis (0.2 M Tris, pH 7.5; 50 mM EDTA, 2 M NaCl; 2% CTAB), y tras agitar la mezcla se añadieron 30 µL de sarkosil 10%. Los tubos se incubaron durante 30 min a 65°C, se añadió 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se dejó en agitación suave durante 15 min. Después se centrifugó a 12600 rpm durante 5 min y se pasó la fase

acuosa a un tubo limpio. Se añadió un volumen de isopropanol, se agitó suavemente y se volvió a centrifugar (12600 rpm / 15 min). El precipitado resultante se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% y tras centrifugar (12600 rpm / 1 min) se retiró el etanol y se secó en un secador de vacío con sistema Speed Vac® Savant RT100 y SC110 (Savant Instruments Inc., Hicksville, USA) calentando 20 min. Una vez seco el precipitado se disolvió en 50 µL de agua mQ estéril y tras su disolución se añadió 1,5 µL de RNAsa 2 mg/µL y se incubó a 37°C durante dos horas o a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se estimó la concentración de DNA en un gel de agarosa al 0.8% mediante la comparación con muestras de DNA del fago λ de concentración conocida. Para la extracción del DNA de las plantas utilizadas en la caracterización y mapeo fino de *FAQ3* y *FAQ2* se utilizó el mismo protocolo de extracción pero se modificó el paso inicial de molido del tejido. El material vegetal se recogió en un tubo de 2 mL donde se incluyeron bolas de cristal de 2 mm de diámetro. Posteriormente, tras añadir el tampón de extracción en cada tubo, éstos se colocaron en un molino mezclador MM300 (Retsch, Haan, Alemania) que mediante agitación de los tubos disgrega el tejido.

4.2 Desarrollo y análisis de marcadores moleculares

En este trabajo el genotipo de las plantas se ha establecido mediante tres tipos de marcadores de DNA analizados por PCR: microsatélites (SSLPs, Bell y Ecker, 1994), INDELs (Inserción/Delección, Longman-Jacobsen y col., 2003) y CAPSs (Konieczny y Ausubel, 1994). Para el desarrollo de nuevos marcadores se utilizó la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis* de la accesión Columbia (Col) (AGI, 2000), la base de datos de Cereon que contiene polimorfismos de secuencia entre Ler y Col (<http://www.arabidopsis.org/cereon/>) y la base de datos que recoge polimorfismos entre 96 accesiones de *Arabidopsis* (<http://walnut.usc.edu/apache2-default/2010/index-old.html>; Nordborg y col., 2005). A partir de estas bases de datos y la literatura se seleccionaron marcadores microsatélites que contenían polimorfismos de 10-20 pb y que amplificaban bandas de 150-250 pb. Los productos de la amplificación de estos marcadores en las accesiones de interés (Ler, LI-0, C24, Ri-0 y Shak) obtenidos por PCR se separaron en geles de agarosa al 3-3,5% en tampón TBE 0,5X.

Para desarrollar nuevos marcadores de tipo INDEL se usó la base de datos de inserciones/delecciones entre Ler y Col. Se buscaron polimorfismos de 15-30 pb entre estas dos accesiones y sobre la secuencia de Col, se diseñaron oligos distanciados de 200 a 400 pb que incluían los polimorfismos seleccionados. El DNA producto de la amplificación por PCR de estos fragmentos en las accesiones de interés (Ler, LI-0, C24, Ri-0, y Shak) se separó en geles de agarosa al 2-2,5% en tampón TBE 0,5X.

Para el desarrollo de marcadores CAPSs se utilizó la base de datos de Cereon que recoge este tipo de polimorfismos entre Ler y Col y la base de datos de polimorfismos de secuencia entre 96 accesiones (Nordborg y col., 2005). La primera base de datos especifica los polimorfismos nucleotídicos y los enzimas de restricción que los detectan. Sobre la secuencia genómica de Col se diseñaron parejas de cebadores separados aproximadamente 500-600 pb flanqueando el polimorfismo seleccionado. Al diseñar estos marcadores se intentó que las longitudes predichas de las bandas generadas tras la digestión con el correspondiente enzima de restricción se diferenciase alrededor de 100-200 pb. Con estos cebadores se amplificó por PCR el DNA de Ler, C24, Ri-0 y Shak. Tras comprobar la calidad y la cantidad de DNA amplificado en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X, éste se digirió con el enzima correspondiente siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los fragmentos de digestión se separaron en geles de agarosa al 1,5-2% en tampón TBE 0,5X. La base de datos de polimorfismos de las 96 accesiones se utilizó para generar nuevos marcadores CAPS entre Ler y LI-0 ya que ambas están incluidas. Una vez identificado un polimorfismo nucleotídico entre Ler y LI-0 en la posición de interés se determinó si existían dianas de restricción que incluyeran ese SNP, utilizando el programa informático dCAPS finder (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>).

Una vez determinado el enzima que digiere diferencialmente la secuencia de interés, se diseñaron parejas de cebadores distanciados 500-600 pb sobre la secuencia de *Ler*.

Para el diseño de los oligos de todos los marcadores generados se utilizó el programa GeneRunner (Hastings Software Inc., NY, USA). Además se desarrolló un marcador INDEL y otro de tipo CAPS para el gen *CRY2* a partir de las secuencias descritas por Olsen y col. (2004)

Para la construcción del mapa genético *Ler*/LI-0 se utilizaron 43 marcadores microsatélites mostrados en la **Tabla 3** (Bell y Ecker, 1994; Clauss y col., 2002; Loudet y col., 2002; <http://www.arabidopsis.org/>) y, además se generaron 37 marcadores INDEL (**Tabla 4**) y 14 marcadores CAPS (**Tabla 5**).

Nombre	Cr	Posición (Mb)	BAC	Fragmento (pb) <i>Ler</i>	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
nga59	1	0,000	T25K16	115	120	f-gCATCTgTgTTCACCTCgCC r-TTAATACATTAgCCCgAgCCCG
F19P19	1	1,150	F19P19	191	185	f-CCACgTAggTCAAgAAGAAgAAG r-TgTCgTgCTgCgATAgAgAgAg
ICE10	1	4,000	F12F1	180	185	f-AACATCCACAAGTTTCTAAACAATC r-gACTCTTATgggTAAGCTCCTTg
AthZFG	1	8,720	F21J9	139	134	f-TTgCgTTTCACATTTgTTT r-TgggTCAATTCACATgTAgAgA
nga392	1	9,830	F13K9	162	160	f-TTgAATAATTTgTAgCCATg r-ggTgTTAAATgCgTgTgTTC
AthSO392	1	10,900	T5I8	156	142	f-TTTgAgTgTAgACACggATCTg r-gTTgATCgCAGCTTgATAAgC
T27K12	1	15,920	F7F22	153	185	f-ggACAACgTCTCAAAcggTT r-ggAggCTATACgAATCTTgACA
F19K23	1	23,000	F19K23	190	200	f-ggTCTAATgCCgTgTgTgC r-gAATTCTgTAACATCCCATTTCC
msat1.13	1	25,820	F24J5	205	220	f-CAACCACCAgCTC r-gTCAAAcCgTTCATCA
nga111	1	27,350	F28P22	163	160	f-CTCCAgtTggAAgCTAAAggg r-TgTTTTTAggACAAATgCg
nga 692	1	28,840	F28O16	107	115	f-TTTAgAgAgAgAgAgCgCg r-AgCgTTTAgCTCAACCTAgg
msat2.5	2	0,200	F2I9	227/200	175	f-TgAgAgggACAgATAggAA r-ATCAAAAgggATACTgACAA
msat2.38	2	2,450	F18P14	230	210	f-TgTAACgCTAATTTAATTg r-CgCTCTTTCTgCTCTg
F3PII-6b	2	8,430	F27F23	263	210	f-TTCAATCTTCTCTACTgTCTTCg r-AgCAGgAAGTAgTAAGTggAATA
CZS0D2	2	12,000	F24D13	170	190	f-gAATCTCAATATgTgTCAAC r-gCATTACTCCgTgTgTCTC
msat2.7	2	13,190	F7F1	251	257	f-CTCAAATCAAgAACgCTgAC r-CCCGATATAgACAACgACAA
MB36	2	18,470	F16B22	300	400	f-CgTgAAgCTTTAggAgTCC r-TggATTCTgTTgCATgATgCg
msat2.22	2	19,670	T9J23	230	243	f-CgATCCAATCggTCTCTCT r-TggTAACATCCCGAATTC
nga32	3	0,370	F1C9	256	252	f-ggAgACTTTTTgAgATTggCC r-CCAAAACAATTAgCTCCCCA
NT204	3	5,570	T2O4/ MDC8	122	145	f-TggAAGCTCTAgAAACgATCg r-ACCACCTAAACgAgAATTg
msat3.19	3	8,800	K7M2	130	166	f-TAATTCgATCCAATTgACAT r-TggCTTggCACAAAC
AthGAPAb	3	9,800	MLJ15	150	142	f-CACCATggCTTCgTTCATT r-TCTTgAgAATTCAgTgAAACCC
msat3.32	3	11,200	MXQ21	176	173	f-gCACTTgCAGCTTAACCT r-CgTgACTgTCAAAcCg

Nombre	Cr	Posición (Mb)	BAC	Fragmento (pb) Ler	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
msat3.21	3	17,280	T6H20	169	149	<i>F</i> -TTACCCCGAgCTTgA <i>F</i> -TgAATCATggTgCTTCTA
T16K5-TGF	3	18,400	T16K5	140	130	<i>F</i> -TTgTCgAAATAAAAAATTgACCGTTA <i>F</i> -TggATgTggATTCTATTgTTTCTCA
msat3.13	3	21,380	F15B8	235	245	<i>F</i> -TTgCCATgAgTgTTgTgTg <i>F</i> -gACAACTgCgCCAATTAg
nga 6	3	23,040	T17J13	123	113	<i>F</i> -TggATTTCCTTCCTCTCTTCAC <i>F</i> -ATggAgAAgCTTACACTgATC
nga8	4	5,600	T32A17	198	164	<i>F</i> -gAgggCAAATCTTTATTTTCgg <i>F</i> -TggCTTTTCgTTTATAAACATCC
CM6	4	7,900	T6G15	150	140	<i>F</i> -CTCgTAgTgCACTTTTCATCA <i>F</i> -CACATggTTAgggAAACAATA
G3883-1.4	4	10,610	G3883-1.4	700	1400	<i>F</i> -TgTTTTCAgAgTAGCCAATTC <i>F</i> -CATCCATCAAAACAACTCC
CM7	4	11,520	F17L22	121	100	<i>F</i> -AATTTgAgATTAgCTggAAT <i>F</i> -CCATgTTgATgATAgCACAA
nga 1139	4	16,440	F10M10	121	98	<i>F</i> -TAGCCgATgAgTTggTACC <i>F</i> -TTTTTCCTTgTgTgCATTC
msat4.37	4	18,330	F23K16	121	139	<i>F</i> -CgTTTCATCAAgTTCCgA <i>F</i> -TAggAggTTATCATgCgTg
nga225	5	1,500	MUG13	189	140	<i>F</i> -gAAATCCAAATCCCAgAgAgg <i>F</i> -TCTCCCACTAgTTTgTgTCC
ICE1	5	5,400	MQK4	64	75	<i>F</i> -gAagAAACgAAgACgAAgAAgTCg <i>F</i> -CCCTTTTgTCTTCTCTCTTCTC
nga139	5	8,400	K18F6	132	152	<i>F</i> -AgAgCTACCgATCCgATgg <i>F</i> -ggTTTCgTTTCACTATCCAgg
nga76	5	10,400	F24J2	350	250	<i>F</i> -ggAgAAAATgTCACTCTCCACC <i>F</i> -AggCATgggAgACATTTACg
msat5.22	5	13,960	MWP19	325	280	<i>F</i> -AgAACAAgTTAggTggCT <i>F</i> -gggACAAGAAATggAgT
ICE3	5	16,140	MPO12	110	140	<i>F</i> -gACTAATCATCACgACTCgCCAC <i>F</i> -ATTCTTCTCACTTTTCTTgATCCg
msat5.9	5	17,300	MBD2	225	215	<i>F</i> -CgTCATTTTTCgCCgCTCT <i>F</i> -CATggTggCgCgTAGCTTA
nga129	5	20,130	K6M13	179	170	<i>F</i> -TCaggAggAACTAAAgTgAggg <i>F</i> -CACACTgAAgATggTCTTgAgg
JV65/66	5	22,020	MDK4	177	186	<i>F</i> -TTTCTTTTCACggTTTC-TAACTTTT <i>F</i> -TCATCTTCCCTTTAACTTgATgA
CM10	5	24,540	MSL3	130	150	<i>F</i> -CCACATTTTCCTTCTTTTCATA <i>F</i> -CAACATTTAgCAAATCAACTT

Tabla 3. Marcadores moleculares de tipo SSLP utilizados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.

Nombre	Cr	Posición (Mb)	BAC	Fragmento (pb) Ler	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
F12K11-2	1	2,000	F12K11	100	130	<i>F</i> -TCTCGAATCTAACCAAATGT <i>F</i> -ggAAAAATCAACCTATAAAAC
F14J9	1	3,000	F14J9	180	220	<i>F</i> -CgCAATAACTCgACCGgTAAG <i>F</i> -TTTCACATgCACCTCgCCCTTTC
F7A19	1	4,800	F7A19	285	300	<i>F</i> -TgTTgAGCAGCATAgAggC <i>F</i> -AggTggATCgACTgTgAgg
F6F9-1	1	6,900	F6F9	190	200	<i>F</i> -TCgCATAAACAAAgTAAGC <i>F</i> -CCAAGATTCCAAGTTCAC

Nombre	Cr	Posición (Mb)	BAC	Fragmento (pb) Ler	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
F14M2-2	1	12,270	F14M2	110	120	<i>f</i> -TATATTgTCggAACTgTgTAAg <i>r</i> -TgACATTCggTCCgCTAC
F28J9-2	1	13,720	F28J9	220	210	<i>f</i> -TTgAATggACTTgATACACAC <i>r</i> -ATCaggACAACATATAACAaggC
F6D8-24	1	19,500	F6D8	371	381	<i>f</i> -AATACCgATCCTAAGAAACCTgA <i>r</i> -TCTCAGTgTTTTgCTTgCCTCT
F14J16-53	1	20,850	F20N2	350	340	<i>f</i> -CTgggCTAgTATgATAATgggC <i>r</i> -gggAAgCgTTACCATgTCAC
T8K144	1	29,900	T8K14	524	583	<i>f</i> -CAATgCgCTCTgAATC TCTgAC <i>r</i> -CACTTCgTCgTCTAATCCAgtT
F24C20	2	4,900	F24C-20	263	257	<i>f</i> -CAAAAgCggggAACAAAAATAAT <i>r</i> -gAgATTgAgATTATgggTTATTC
T15J14	2	6,470	T15J14	305	342	<i>f</i> -gCCATCAACggggACgCA <i>r</i> -CTCgACATACGCTAATCCATCCAAG
T20K9-7	2	9,700	T20K9	147	140	<i>f</i> -CACAAACATCCAggTACATAATTCA <i>r</i> -CAAAATAgCCATgTCgATAAC TgTA
F26B6	2	10,000	F26B6	153	186	<i>f</i> -AACTCTATCTgCCCACgAACAA <i>r</i> -TTC TgCAAgCCTCAACTAC TAACTg
T32F12-1	2	14,880	T32F12-1	210	215	<i>f</i> -TTgAATCCggAggCAgAC <i>r</i> -TTTCAACTCATTCTCTCTg
F16M14-10	2	15,990	F16M14	322	342	<i>f</i> -TCATAgCTACAgTCACCAGgAg <i>r</i> -GGCGTTTCTTCTCTTTCACA
T24P15-4	2	17,500	T24P15	395	405	<i>f</i> -ATCAAAATTCgTATCACCGTgC <i>r</i> -ATTTTCCACATTCTTTAggCC
F20H23	3	0,950	F20H23	159	169	<i>f</i> -TACTTgTgATgATTggCTTC <i>r</i> -CATACTACCTCAATCACACAACCG
F2103	3	2,330	F2103	210	230	<i>f</i> -gAgAAATggTggTgTggC <i>r</i> -AAATggAggTACGTgAATgAAC
MJG9-36	3	4,200	MJG9	280	300	<i>f</i> -CgAAGAgACCgAgTTggAATAgT <i>r</i> -gATACCTCTTCTTCTgCTCTCTT
MQC12	3	7,090	MQC12	195	200	<i>f</i> -CACCTATTgCTCTCATTATTg <i>r</i> -TCgACCCATTgTATTgATTTC
T32N15-42	3	16,350	T32N15	458	463	<i>f</i> -TTGTGACGAATAGTGAAGGAGAG <i>r</i> -AAGTGAGATAATGTAATGTCGTGAT
F15B8-6	3	21,780	T20N10	360	370	<i>f</i> -TTTCTgTTgCCTTTTCTCATTgA <i>r</i> -gAGAgTCCATggCAAGCAGT
FRISEQ1	4	0,260	F6N23	597	942	<i>f</i> -CACACCATCACCCCATTAgtT <i>r</i> -CACATATACgTTCCCCCTCC
T1J24-12	4	2,780	T1J24	310	322	<i>f</i> -TTCACgAgggCAAAgCAATA <i>r</i> -AAGTTACGATTGGGGTTTTTgAG
FCA8-62	4	9,650	FCA1	350	410	<i>f</i> -CgCgACTCTCCgggAAgC <i>r</i> -AATATgCTTTAggTTgTTTAgggAA
F22K18	4	12,740	F22K18	175	161	<i>f</i> -gTgACAAAACgTAggAgAACTTAg <i>r</i> -AATATATCCTTTCATTTCCTCAA
F20C9-15	4	14,000	F20C9	350	340	<i>f</i> -TTTATCACATgCgCTAgCC <i>r</i> -gACACTAgCCATTAAATCAACACA
F20C9-15	4	14,000	F20C9	350	340	<i>f</i> -TTTATCACATgCgCTAgCC <i>r</i> -gACACTAgCCATTAAATCAACACA
F6I18-18	4	15,000	F6I18	320	334	<i>f</i> -TCCTTgCTgTTTATTTTTgTgC <i>r</i> -TCTAAATCTACACAACACAggA
T5J17-19	4	18,530	T5J17	264	271	<i>f</i> -AgCACACAgAgATATCgAAAAA <i>r</i> -CTTgCTTTTCACTgCCTCTTT

Nombre	Cr	Posición (Mb)	BAC	Fragmento (pb) Ler	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
MOJ9-45	5	2,180	MOJ9	385	395	<i>f</i> -gTTATgTgTggTggCTTTTCC <i>r</i> -TAAgCACTAgCACACAaggTATT
FLC-b	5	3,170	T3P16	1875	640	<i>f</i> -CTTTATCTgTATgCCTTTgTATg <i>r</i> -gAAACATTgAgAgAACACCTTACCTT
MKE10	5	4,440	MKE10	216	228	<i>f</i> -gTTTgTTgACAgTTTTTCgTgg <i>r</i> -TACAACCTCCAAGTgCCAAAACC
T26D22-43	5	13,500	T26D22	190	215	<i>f</i> -AAATggAAAAgTTgATACAgCT <i>r</i> -ACCAACCTTACTATTACAACACAA
K8L3-15	5	15,000	K8L3	290	299	<i>f</i> -gACTTAgACATgAgCgCCgA <i>r</i> -CAAACCAAAACCCAgAAggA
K18C1-9	5	18,300	K18C1	200	208	<i>f</i> -CTTAACCAACATCagCTTCAT <i>r</i> -gATgTgCTTTTTTATAATTTgAA
MIF21-19	5	19,500	MIF21	360	370	<i>f</i> -TAATgTgAggAgACTgTAACCAAAA <i>r</i> -AATgggTAAAAAgTATCTAAC
K8K14	5	27,000	K8K14	320	290	<i>f</i> -TAAACACCACgACAAATACAACAT <i>r</i> -TTgCTTCCTATATCTACTTg

Tabla 4. Marcadores moleculares de tipo INDEL desarrollados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.

Nombre	Cr	Posición (Mb)	Enzima	BAC	Fragmento (pb) Ler	Fragmento (pb) LI-0	Secuencias Oligos (5'—3')
MN1-17,476	1	17,476	Ddel	F16N3	242 / 487	729	<i>f</i> -AACTTgCCATTgACTgCTCCTT <i>r</i> -TTgCTgTTgTAgATgACCACTCg
MN1-18,340	1	18,340	SspI	F14J22	326 / 131	457	<i>f</i> -CCCAgACATTCACAACCTCATCA <i>r</i> -AggTTgAAGAAATTTGgATgATAgC
MN1-24,694	1	24,694	BclI	T6J19	539	363 / 176	<i>f</i> -gCTAAAAgACAaggCAAAATAAAA <i>r</i> -CTCTCATCgTTgTTCCCTCTAT
MN2-1,150	2	1,150	SrfI	F19B1 1	210 / 387	597	<i>f</i> -CTTCCCTTCACAAAACgCTT <i>r</i> -TgTCATCATCATCATCgTTCCT
MN2-3,541	2	3,541	HaeII	T12J2	619	175 / 444	<i>f</i> -ATgTCCAgCCCCAACCTTCTC <i>r</i> -gTAAACCGATAAgggATgggC
MN3-12,647	3	12,647	BspHI	MJ16	488 / 234	730	<i>f</i> -gCCACATCCgCCAACTA <i>r</i> -ggAgAAgATAATACCTAAGACAACgA
MN3-15,116	3	15,116	Eco010 gl	F7M19	776	245 / 510	<i>f</i> -TTAaggTTTTCgCTTgTTTCTgTA <i>r</i> -AACTCTCTTATTATgTCTgTCCC
MN3-19,627	3	19,627	BsrI	F8J2	353 / 543	896	<i>f</i> -CCTCTTgTTgTTgTTgCTTCTTg <i>r</i> -gggTATTgggAAgAggAgC
MN4-1,442	4	1,442	HpaI	F24C2 1	514 / 213	727	<i>f</i> -CCAgTCATCAggTTgTTTgC <i>r</i> -TTCCGgTCTCgTCTTgT
MN4-4,197	4	4,197	DraI	F28D6	184 / 458	642	<i>f</i> -gCAAAggAgAAgAAgCCAA <i>r</i> -TggCTTTTgTTTATAACATCC
MN4-6,781	4	6,781	NdeI	T22B4	151 / 204	355	<i>f</i> -gCTTgTTTATCTTgTCTCTTCT <i>r</i> -TggCggCATTCAAgAggg
MN5-0,375	5	0,375	EarI	T7H20	700	234 / 466	<i>f</i> -TTggCTCggCggCgA <i>r</i> -gCgCATAggggAgAAgTC
MN5-7,279	5	7,279	NdeI	T6G21	613	198 / 415	<i>f</i> -gTCAAACTTCTCACAATgCTT <i>r</i> -TCATTgTTTgTTTCAggAgTgTg
MN5-10,909	5	10,909	BglII	F7P1	284 / 169	453	<i>f</i> -CgTTCAAggAgTAATAATgCgA <i>r</i> -gATCTTCTgTATTCTTTTTgCAT

Tabla 5. Marcadores moleculares de tipo CAPS desarrollados en la construcción del mapa genético Ler/LI-0.

Para la caracterización y mapeo fino de *FAQ3* y *FAQ2* se utilizaron los marcadores SSLP recogidos en las **Tablas 6, 7 y 8** descritos en la literatura (Bell y Ecker, 1994; Clauss y

col., 2002; Loudet y col., 2002; <http://www.arabidopsis.org/>), y los de tipo INDEL y CAPS desarrollados específicamente para este trabajo en nuestro laboratorio (Tablas 6, 7 y 8).

Nombre	Cr	Posición (Mb)	Tipo Marcador	BAC	Fragmento Ler (pb)	Fragmento donador (pb)	Secuencias Oligos (5'—3')
nga59	1	0,010	SSLP	T25K16	115	150 R, 165 S	f-gCATCTgTgTTCACCTgCC r-TTAATACATTAgCCCgACCCg
F19P19	1	1,157	SSLP	F19P19	192	187 R	f-CCACgTAggTCAAgAAgAAgAAg r-TgTC TgCTgCgATAgAgAgAg
T1G11	1	1,243	SSLP	T1G11	190	198 C	f-gAagACAAAgCTCTgCgTAAATg r-AAT TgCATAAaggCACTTgAAA
F14J9	1	3,088	INDEL	F14J9	180	220 C	f-CgCAATAACTCgACCggTAAg r-TTTCACATgCACTCTCgCCTTTC
ICE10	1	4,020	SSLP	F12F1	180	155 R, 170 S	f-AACATCCACAagTTTCTAAACAATC r-gACTCTTAT gggTAAgCTCCTTg
T16N11	1	5,300	INDEL	T16N11	175	230 R	f-CACAagCCCAgCTTACTgAg r-gggAAgCTAATCAACgAAgAg
T24D18	1	5,508	INDEL	T24D18	230	265 C	f-TATAagAAATgCACTCgTAAAAACA r-ggAACAgAgACTTACCACgAA
F20D23-21	1	5,900	INDEL	F20D23	350	329 S	f-AggTgTTgAAATCCgACTA r-CATgTggCTgTTgATATTg
M-7.340	1	7,340	INDEL	F9H16	163	150 C, Ry S	f-TATCCCCCACAACAACTCAAAC r-CCACgTgTCAGAggAgggTAA
AthZPG	1	8,727	SSLP	F21J9	139	148 C	f-TTgCgTTTCCACATTgTTT r-TgggTCAATTCACATgTAgAgA
F20F5	1	26,464	INDEL	F20F5	319	345 S	f-AggTTATgATgTCTCTAggCTTTTTT r-TTTAAGATgTATggTCACATTTg
T8K144	1	29,878	INDEL	T8K14	524	583 S	f-CAATgCgCTCTgAATCTCTgAC r-CACTTCGTCGTCTAATCAGGT
nga1145	2	0,683	SSLP	T8K22	215	205 C	f-CCTTCACATCCAAACCCAC r-gCACATACCACAACCAgAA
F15N24	2	6,030	SSLP	F15N24	2800	1800 C	f-ACgAATAATgCgAgggAAgCTACg r-ATTggTggACgATTCAggC
T16B14	2	9,398	INDEL	T16B14	196	251 S	f-CAAgCATTgCgCATCATCgTCAC r-gTgTCgCCCCCTTCTCTTTTgTAT
FLS7	2	9,810	SSLP	F21P24	119	100C	f-gATgAAATCTTCTCgTCCAAAT r-gACAACTAAACAACATCCTTC TT
T19I1814	2	11,146	INDEL	T19L18	250	264 S	f-AAAAgTAACtAgATgAAgAAAAgAAA r-gCTATATATgAgAgATgTTTTgA
nga361	2	13,229	SSLP	T16B12	130	114 S	f-AAAgAgATgAgAATTTggAC r-ACATATCAATATATTAAgTAgC
nga172	3	0,789	SSLP	T21P15	130	154 S	f-AgCTgCTTCCTTATAgCgTCC r-CATCCgAATgCCATTgTTC
F14P13-9	3	3,199	INDEL	F14P13	145	136 R, S	f-ACgAggAAAAgACgAAgAAgAAgA r-CggCggAATggTCAACACA
MUG9-36	3	4,228	INDEL	MUG9	280	300 S	f-CgAAgAgACCgAgTTggAATAgT r-gATACCTCTTCCTTCTgCTCTCTT
NT204	3	5,570	SSLP	T204/ MDC8	130	145 S	f-TggAAgCTCTAgAAACgATCg r-ACCACCTAAACCgAgAATTgg
proFR12	4	0,270	INDEL	F6N23	470	815 R	f-CTAgTACCgTCAGCCCAATg r-CgCgAgCTAATTCgTC TATggA
Jv61/62	5	22,527	SSLP	MDF20	185	165 S	f-CgCTTTCCTTgTTCATTCC r-AAATgCAAATATTgATgTgTgAAA
OR5-24,45	5	24,453	INDEL	MUP24	359	401 S	f-ACATCTAATCgTTTgACTTgACAC r-AgACgAgAATCAAgAgAggg
MX3	5	25,500	INDEL	MX3	247	233 R	f-CCTgATCTgTgTTCTgTgTCCCA r-TgATCAgCTTCTCgTTggTACCC

Tabla 6. Marcadores moleculares utilizados en la selección de líneas de introgresión FAQ3 y FAQ2.
Las letras C, R y S indican las accesiones C24, Richmond-0 y Shokdara respectivamente.

Nombre	Posición (Mb)	Tipo Marcador	BAC	Fragmento(pb) Ler	Fragmento(pb) Shak	Secuencias Oligos (5'—3')
F4P13	0.209	INDEL	F4P13	329	358	<i>f</i> -ggCCTgTTTTgTTTgTgACTTg <i>r</i> -AACTCgCTTCAC TTC TTggCA
nga32	0.379	SSLP	F1C9	256	252	<i>f</i> -ggAgACTTTTTgAgATTggCC <i>r</i> -CCAAAACAATTAgCTCCCA
nga 172	0,786	SSLP	T21F5	130	154	<i>f</i> -AgCTgCTTCCTTATAgCgTCC <i>r</i> -CATCCgAATgCCAT TgTTC
T11L18	1.021	INDEL	T11L18	172	183	<i>f</i> -gCTTTACTgATTGCTATATTgA <i>r</i> -ACgAggAATTCTAAGcACAAAT
T12H1b	1,510	CAPS	T12H1	150/120	270	<i>f</i> -CTgATCATTgCTCTCTTCTC <i>r</i> -AgAATCTCCACACCCATC
F22F7	1.585	INDEL	F22F7	292	309	<i>f</i> -TTATCgCCgTTAgTTTACCCA <i>r</i> -TgAggACGAgAAACgTATATACATC
T8E24	2,073	CAPS	T8E24	160/110	270	<i>f</i> -TCACTggAATCTTTggAgg <i>r</i> -gCaggCATCCAAGTTgAg
F17A9b	2,231	CAPS	F17A9b	230/30	260	<i>f</i> -gACATTAgTgCATgTAAAggC <i>r</i> -TCTTgCTgTTTgATTACTCg
F2103	2,407	INDEL	F21C3	210	230	<i>f</i> -gAgAAATggTggTgTggC <i>r</i> -AAATggAggTACgTgAATgAAC
AthCHB2	3,963	SSLP	T2E22	96	91	<i>f</i> -ggATCCAAGTgCTCATATATAC <i>r</i> -CTTTTCgTTTC TAAATAgAgAgC
MJG936	4,228	INDEL	MJG9	280	300	<i>f</i> -CgAAGAgACCGAgTTggAATAgT <i>r</i> -gATACCTCTTCTTCTgCTCTCTT
MDC16-34	4,595	INDEL	MDC16	325	359	<i>f</i> -ATTgTCTTAACTgATTgTTggCA <i>r</i> -ACCTTCTTCTTACTCAATgTgTTT
NT204	5,570	SSLP	T2O4	130	145	<i>f</i> -TggAAGCTCTAgAAACgATCg <i>r</i> -ACCACCTAAACCgAgAATTgg

Tabla 7. Marcadores moleculares utilizados en la obtención de línea de mini-introgresión en la región *FAQ3*.

Nombre	Posición (Mb)	Tipo Marcador	BAC	Ler	C-24	Ri-0	Shak	Secuencias Oligos (5'—3')
nga59	0,01	SSLP	T25K16	115		150	165	<i>f</i> -gCATCTgTgTTCACCTgCC <i>r</i> -TTAATACATTAgCCCAgACCCg
T7I23	0,43	SSLP	T7I23	195	204			<i>f</i> -CATgCACgTACgATTgTTTAAAC <i>r</i> -gTgTCCTTTTTCTCAACgATg
F21B7	0,923	SSLP	F21B7	195	205		205	<i>f</i> -CACgATATgATCAAgCTTTAAACg <i>r</i> -TgACTACA TggAgATTATgGCC
F20D22	1.070	SSLP	F20D22	195	190			<i>f</i> -CCCAAgTgACgTCTggTTTC <i>r</i> -AACAAAATgAgTTTCTCTgCATg
F19P19	1.157	SSLP	F19P19	192	200			<i>f</i> -CCACgTAggTCAAgAAGAAgAAG <i>r</i> -TgTC TgCTgCgATAgAgAgAg
CRY-2B	1.185	INDEL	F19P19	325	264		264	<i>f</i> -CCgATggCCACgAgCTTg <i>r</i> -TTgTTCCgAgTTCCACACCAg
CRY2BFA	1.185	CAPS	F19P19	300/50	350		350	<i>f</i> -AAGAgCTTCAAgATggTggATg <i>r</i> -CCCTTTTCgCagTATATCTCCC
T1G11	1,243	SSLP	T1G11	190	198	198	206	<i>f</i> -gAAGACAAAgCTC TgCagTAATg <i>r</i> -AATTgCATAAaggCACTTgAAAg
T25N20	1,601	INDEL	T25N20	165	180	180		<i>f</i> -AgCACCTCTCCCTACTCCA <i>r</i> -AAGTTTgCgAATCgTgTggAg
M1.70	1.705	INDEL	F3F20	272	256	256		<i>f</i> -ggCgACCAAgATgTgCgg <i>r</i> -TggATTCCggATTgCATAAgc
M1.73	1.725	INDEL	F3F20	89	98			<i>f</i> -AACTggCgAAATTTCCCTAg <i>r</i> -CCTTAATCAGTACggTCCTTTTg
M1.96	1,964	INDEL	F12K11	337	323		323	<i>f</i> -gAgAggATAAA TgCTgTCAAATA <i>r</i> -gCTACTATA TggTgCTTTTACTCTC

Nombre	Posición (Mb)	Tipo Marcador	BAC	Ler	C-24	Ri-0	Shak	Secuencias Oligos (5'—3')
M2.04	2.047	INDEL	F12K11	212	220			<i>F</i> -TATCCgAAACCAACCAATCAgC <i>r</i> -CgCTgggATgAggAggAAgAT
M2.31	2.31	CAPS	F24B9	172/181	453			<i>F</i> -ATCAAAACAAATAATCCATCCAATAAAC <i>r</i> -AAATCATATgTAAAACTTggAgAgCA
F24B9	2.429	INDEL	F24B9	120	130	130		<i>F</i> -TgTTTCACCAgCCTCCTC <i>r</i> -AgATTAgAC.TgCgTgTggC
M2.83	2.83	INDEL	F7G19	396	407		407	<i>F</i> -gCAAgCagAATAgATgAgCCT <i>r</i> -gTTTCTTATACCCTTCTTCACATgg
F14J9	3.088	INDEL	F14J9	180	220			<i>F</i> -CgCAATAACTCgACCggTAAg <i>r</i> -TTTCACATgCAGTCTCgCCTTTC
F21M11	3.11	INDEL	F21M11	140			220	<i>F</i> -AAAAgAACAAATTATgCAAAC <i>r</i> -TTAggACACAATTTCATgACg
F21M12	3.21	SSLP	F21M12	150	200			<i>F</i> -ggCTTCTCgAAATC.TgTCC <i>r</i> -TTACTTTTgCCTCTTg TCATTg
M3.32	3.320	INDEL	F14N23	145	179	179		<i>F</i> -TTgTTTACTCTgATggTggTCCTA <i>r</i> -CAgggATAAgTTgTCTCTCTAAgTg
M3.52	3.523	INDEL	F20B24	305	310			<i>F</i> -TTgTTCTTCTCCTCAGTCTCg <i>r</i> -gAATgCCgTTAggTggAAgC
M3.62	3.615	INDEL	T19D16	310	318	318	318	<i>F</i> -AggCAACCAATACATgAgAgCA <i>r</i> -TgTTCgTgTgTTTggAgggAT
M3.92	3.925	INDEL	F25C20	246	274			<i>F</i> -TATTAgTATgATTgTTgTTATTATTCTTT <i>r</i> -TCgTAAACAAAggAgTggAg
ICE10	4.02	SSLP	F12F1	180		155	170	<i>F</i> -AACATCCACAAGTTTC.TAAACAATC <i>r</i> -gACTCTTATgggTAAgCTCCTTg
F3F19	4.43	INDEL	F3F19	130			220	<i>F</i> -TTTCATCACTACAT TCCACTCAC <i>r</i> -CTCgTCTCAATTTCCCTCAAg
M4.49	4.490	INDEL	F3F19	243	264	264		<i>F</i> -CAACAATgAgTCgTCTggAAA <i>r</i> -AgTCAATgTTAggTggATgTgTA
T24D18	5.508	INDEL	T24D18	230	265	265	255	<i>F</i> -TATAAgAAATgCACTCgTAAAAACA <i>r</i> -ggAACAgAgACTTACCACCgAA

Tabla 8. Marcadores moleculares utilizados en la obtención de líneas de mini-introgresión en la región *FAQ2*.

Además para la caracterización de las accesiones parentales implicadas en *FAQ2* también se utilizaron dos marcadores desarrollados en el locus *CRY2* (Tabla 9). El marcador *CRY2*-INDEL permite distinguir los haplotipos A y B y el marcador *CRY2*-Bfa distingue los subhaplotipos A^S y A^Q.

Nombre	Posición (Mb)	Tipo Marcador	BAC	Tamaño alelos (Haplogrupo)		Secuencias Oligos (5'—3')
<i>CRY2</i> -INDEL	1.185	INDEL	F19P19	325 (A)	264 (B)	<i>r</i> -CCgATggCCAgAgCTTg <i>r</i> -TTgTTCCgAgTTCCACAACAg
<i>CRY2</i> -Bfa	1.185	CAPS	F19P19	300 / 50 (A ^S)	350 (A ^Q)	<i>r</i> -AAgAgCTTCAAgATggTggATg <i>r</i> -CCCTTTTgCgAgTATACTCCg

Tabla 9. Marcadores moleculares utilizados en el análisis haplotípico de *CRY2*

Las reacciones de amplificación por PCR de los marcadores moleculares utilizados en este trabajo (microsatélites, INDELs y CAPSs) se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 10 ng de ADN genómico, 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3), 5% DMSO, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador y 0,2 unidades de AmpliTaq ADN polimerasa (Perkin Elmer, California, USA). Los marcadores se amplificaron en termocicladores Perkin Elmer 9600, Perkin Elmer 9700 y termocicladores MWG Primus 96 plus (MWG Biotech Inc, Mendenhall, USA) con un programa de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min o 2 min dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar.

5. Análisis estadísticos y genéticos

5.1 Análisis estadísticos

Para determinar si la distribución de los valores fenotípicos medios de las RILs Ler/LI-0 se ajustaban a una distribución normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0,01$). Ninguna de las distribuciones de frecuencias se ajustó a una distribución normal por lo que se realizó una transformación logarítmica en base 10 de los datos. La distribución de cada variable transformada tampoco se ajustó a una distribución normal. Para determinar si los bloques en los que se organizaron los experimentos de la población de RILs mostraron algún efecto en las variables analizadas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) bifactorial utilizando como factores el genotipo (RILs) y el bloque. En todos los ambientes analizados se identificó efecto de bloque si bien en ninguno de ellos éste explicó más del 3% de variación de las variables analizadas por lo que este factor se eliminó de los análisis posteriores. La heredabilidad en sentido amplio (h^2) de cada variable se calculó a partir del ANOVA utilizado para determinar los efectos de bloque. La interacción entre las RILs y los distintos ambientes (G x A) se analizó mediante un ANOVA bifactorial utilizando como factores el genotipo (número de cada RIL) y el ambiente. La correlación de las variables entre distintos ambientes y entre las variables NTH y TF en cada ambiente se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r).

La comparación de valores fenotípicos medios de los distintos genotipos utilizados tanto en el estudio de la respuesta de la floración a la vernalización de Ler y LI-0 como en el análisis de FAQ3 y FAQ2, se realizó mediante el test t de Student para muestras independientes ($P < 0,01$).

Los distintos tests estadísticos se realizaron con los paquetes SPSS v14 (SPSS Inc., Chicago, USA) y Statistica v7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

5.2 Construcción del mapa genético Ler/LI-0

Para construir el mapa genético se analizó la matriz de datos de 139 RILs y 95 marcadores con el programa Joinmap v3 (Van Ooijen y Voorrips, 2001) empleando el tipo de población "Recombinant Inbred" (RI8) en la generación F_8 . Este programa calcula las frecuencias de recombinación (FR) y los valores LOD asociados entre todos los pares de marcadores y contrasta la segregación observada y esperada para cada marcador mediante los test de chi-cuadrado ($P < 0,01$).

Los marcadores se asignaron a grupos de ligamiento (GL) a partir de las FR y LOD asociados utilizando el módulo *Grouping* de Joinmap. De esta forma se asignaron los 95 marcadores a 5 grupos de ligamiento (GL) que fueron significativos a un valor de LOD de 9.

Posteriormente, dentro de cada GL se estableció el orden de los marcadores con el módulo *Mapping* de Joinmap y unos valores umbrales de FR de 0,35 y LOD asociado de 2. Sólo en el caso de GL2 se aumentó el umbral de FR a 0,4 debido al escaso ligamiento del marcador msat2,5 con el resto de marcadores del mismo GL. Las frecuencias de recombinación se convirtieron en distancias de mapa (en cM) mediante la función de Kosambi (Kosambi, 1944).

5.3 Análisis de QTLs

La detección y localización de QTLs en el mapa genético Ler/LI-0 se realizó utilizando los valores fenotípicos medios (originales y transformados) de las 139 RILs analizadas con el programa MapQTL v4.0 (Van Ooijen y Maliepaard, 1996; Van Ooijen y col., 2002). Los análisis de QTLs se realizaron con los datos originales sin transformar y con los transformados sin encontrarse diferencias entre ambos por lo que únicamente se presentan los análisis de los datos sin transformar (ver **Resultados**). MapQTL incluye el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Lehmann, 1975), el método de mapeo de intervalos (*Interval Mapping*; IM) (Lander y Botstein, 1989, Van Ooijen, 1992) y el método del modelo de múltiples QTLs o *Multiple QTL Mapping* (MQM) (Jansen y Stam, 1994). Inicialmente se analizaron los datos con el método de

Kruskall-Wallis y el método de IM identificando los posibles QTLs de mayor efecto. Posteriormente se realizó el análisis definitivo con el método MQM en el que se utiliza como cofactor un marcador por QTL, para que al mapear cada QTL se elimine la variación residual causada por los restantes QTLs (Jansen y Stam, 1994). El mapeo de MQM se realizó de forma gradual seleccionando como cofactor el marcador más ligado al QTL de efecto mayor en el análisis de IM y se añadieron nuevos QTLs al modelo en función de su mayor efecto. Finalmente se permutaron los cofactores entre los marcadores adyacentes para obtener el modelo más probable de localización de los QTLs, es decir, el que mayor proporción de la varianza explica.

Los valores umbral de LOD utilizados para determinar la existencia de un QTL se estimaron con MapQTL mediante un análisis de 10.000 permutaciones de los datos fenotípicos sobre las RILs (Churchill y Doerge 1994). Así se determinaron los umbrales empíricos de LOD para cada cromosoma y para todo el genoma con niveles de significación de $P < 0,05$ y $P < 0,01$ (Tabla 10).

	NV					VDL					VDC				
	TF	NTH	NHR	NHC	TB	TF	NTH	NHR	NHC	TB	TF	NTH	NHR	NHC	TB
GL1	2,0/2,7	2,0/2,7	2,0/2,7	2,0/2,8	2,0/2,7	1,9/2,7	1,9/2,6	2,0/2,7	2,0/2,7	1,9/2,7	2,0/2,7	1,9/2,7	1,9/2,7	2,0/2,7	2,0/2,7
GL2	1,8/2,6	1,8/2,5	1,8/2,5	1,9/2,6	1,8/2,6	1,8/2,5	1,8/2,5	1,8/2,5	1,8/2,6	1,8/2,5	1,8/2,7	1,8/2,5	1,8/2,2	1,8/2,5	1,8/2,7
GL3	1,8/2,5	1,9/2,6	1,9/2,6	1,9/2,6	1,8/2,5	1,8/2,5	1,9/2,6	1,8/2,6	1,9/2,5	1,8/2,5	1,9/2,7	1,9/2,5	1,8/2,5	1,9/2,5	1,9/2,7
GL4	1,8/2,5	1,7/2,5	1,7/2,4	1,7/2,5	1,8/2,5	1,8/2,5	1,7/2,4	1,7/2,4	1,7/2,5	1,8/2,5	1,8/2,5	1,7/2,4	1,7/2,4	1,7/2,4	1,8/2,5
GL5	1,9/2,6	2,0/2,7	1,9/2,6	2,0/2,7	1,9/2,6	1,9/2,7	1,9/2,6	1,9/2,6	1,9/2,6	1,9/2,7	2,0/2,7	1,9/2,7	1,9/2,6	1,9/2,7	2,0/2,7
Genómico	2,6/3,3	2,6/3,3	2,6/3,3	2,6/3,4	2,6/3,3	2,6/3,3	2,6/3,2	2,6/3,3	2,6/3,3	2,6/3,3	2,6/3,4	2,6/3,2	2,5/3,2	2,6/3,3	2,6/3,4

Tabla 10. Umbrales de LOD para la detección de QTLs.

Para cada carácter se indican los valores umbrales de LOD a nivel cromosómico (GL1 a GL5) y a nivel genómico a una $P < 0,05$ (izquierda) y a una $P < 0,01$ (derecha).

La localización de cada QTL se estableció mediante un intervalo de 2 unidades LOD alrededor del marcador que presentaba mayor LOD que equivale a un intervalo de confianza de aproximadamente el 95% (Van Ooijen, 1992). El efecto alélico aditivo de cada QTL se estimó como la diferencia entre la media fenotípica de los individuos homocigóticos Ler y la media de los homocigóticos LI-0. El porcentaje de la varianza explicado por cada QTL y el total de la varianza explicada por todos los QTLs significativos, se calcularon con MapQTL empleando el modelo final de MQM en el que se fijó un cofactor por QTL.

La interacción entre pares de QTLs (QTL x QTL), se estimó mediante análisis de varianza bifactoriales utilizando como factores fijos los marcadores más ligados a cada QTL.

La interacción entre cada QTL y los ambientes analizados (QTL x A) se estimó mediante un ANOVA bifactorial de medidas repetidas en el que se utilizaron como factores el marcador más ligado al QTL y el ambiente (medidas del mismo carácter en distintos ambientes de las RILs). Las interacciones QTL x A se analizaron utilizando el ambiente no vernalizado con cada uno de los dos ambientes vernalizados por separado.

La colocación de QTLs identificados en distintos ambientes o de QTLs que afectan a distintos caracteres se estableció mediante la comparación de la posición de los intervalos de 2 unidades de LOD. Aquellos QTLs cuyos intervalos solaparon, se consideró que podrían corresponder al mismo locus, mientras que los no solapantes corresponderían a diferentes loci.

Todos los análisis de varianza ANOVA se realizaron con el paquete estadístico SPSS v14.

III.RESULTADOS

1. Disección genética de la variación para el tiempo de floración en respuesta a la vernalización en la población de RILs Ler/LI-0

1.1 Análisis de la floración de Ler y LI-0 en respuesta a la vernalización

Con el objetivo de estudiar detalladamente la respuesta a la vernalización de Ler y LI-0, se analizó el tiempo de floración de ambas accesiones tras someterlas a tratamientos de vernalización durante uno, dos y tres meses en condiciones de fotoperiodo de DL y DC. Después del tratamiento de vernalización las plantas se transfirieron a cámaras de ambiente controlado en las mismas condiciones de fotoperiodo de DL donde se analizó el NTH y el TF. Las plantas de Ler vernalizadas florecieron a la vez en NTH que las no vernalizadas (**Figura 8 y 9**) independientemente del fotoperiodo en el que se realizó la vernalización ($P>0,01$). Por el contrario, las plantas LI-0 vernalizadas fueron significativamente más tempranas que las no vernalizadas ($P<0,01$) y florecieron prácticamente con igual NTH ($P>0,01$) independientemente del tiempo de vernalización y del fotoperiodo de la vernalización. En cuanto al TF, las plantas no vernalizadas de ambas accesiones fueron más tardías mientras que las vernalizadas tres meses fueron las más tempranas. Las plantas vernalizadas uno y dos meses florecieron con valores intermedios presentando un tiempo de floración más reducido cuanto mayor es la exposición a temperaturas bajas. Las condiciones de fotoperiodo durante el periodo de vernalización no provocaron diferencias significativas ni en el NTH ni en el TF de ninguno de los genotipos.

Cuando se comparan ambas accesiones (**Figuras 8 y 9**) las plantas Ler fueron considerablemente más tempranas que las LI-0 en ausencia de vernalización tanto para NTH como TF ($P<0,01$). Por el contrario, las plantas LI-0 fueron más tempranas que las Ler, después de cualquier tratamiento de vernalización, si bien las diferencias observadas no fueron siempre significativas ($P>0,01$).

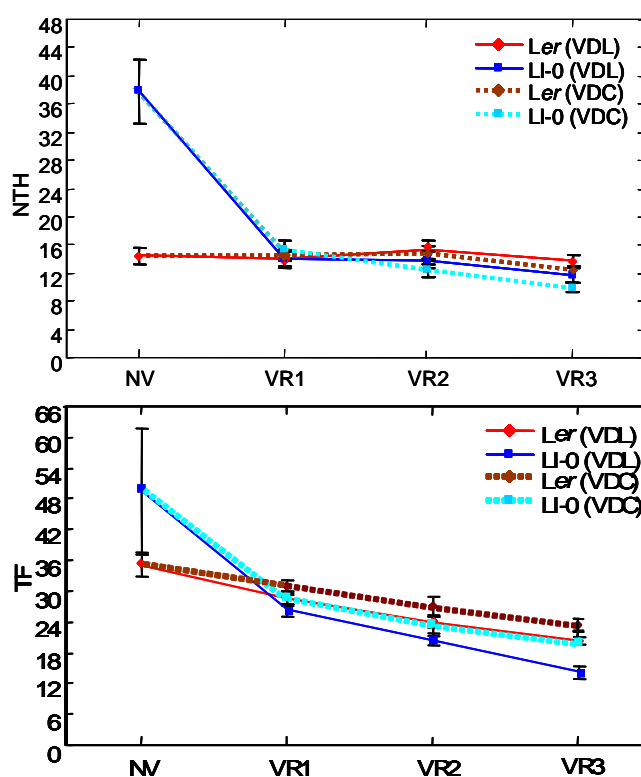


Figura 8. Respuesta de floración a la vernalización de Ler y LI-0

Para cada genotipo se presenta la media \pm DE del NTH (arriba) y del TF (abajo) de 15-20 plantas. En el eje de abscisas se indica el tiempo de vernalización: NV: no vernalizadas. VR1: un mes de vernalización. VR2: dos meses de vernalización. VR3: tres meses de vernalización. VDL: vernalización en día largo. VDC: vernalización en día corto.

Estos resultados indican que en estas dos accesiones el tratamiento de vernalización es igualmente efectivo en DL o DC y que las plantas LI-0, a diferencia de las Ler, florecen con menor NTH cuando se vernalizan. La respuesta de vernalización de LI-0 se caracteriza por ser muy rápida ya que se satura con el primer mes de exposición a bajas temperaturas. Para el TF ambas accesiones responden a la vernalización de forma cuantitativa aunque LI-0 presenta una respuesta mucho más acusada que Ler. Por lo tanto LI-0 es más sensible a la vernalización que Ler.

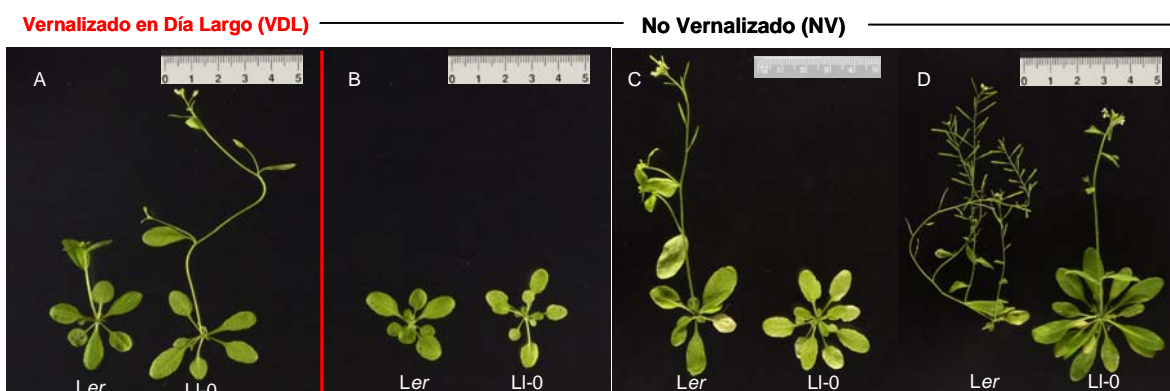


Figura 9. Fenotipo de floración de Ler y LI-0 en respuesta a la vernalización

A. Plantas Ler y LI-0 cultivadas 29 días después de ser vernalizadas 3 meses (5°C) en estado de plántulas (ver **Materiales y Métodos**). B, C y D. Plantas Ler y LI-0 de 29, 43 y 68 días de edad respectivamente que no han sido vernalizadas. Todas las plantas se cultivaron en condiciones de DL en el invernadero.

1.2 Construcción de una población de líneas recombinantes consanguíneas Ler/LI-0

Para determinar la base genética de las diferencias de floración entre Ler y LI-0 se obtuvo una población de líneas recombinantes consanguíneas (RILs) a partir del cruzamiento de ambas. Así se obtuvo descendencia F_1 utilizando Ler como parental femenino del cruzamiento. Con el fin de determinar el grado de dominancia del fenotipo de floración de Ler y LI-0 se analizó el NTH y el TF de las plantas F_1 y los genotipos parentales en condiciones de DL. Como se muestra en la **Figura 10** las plantas F_1 fueron más tardías que los genotipos parentales y florecieron con mayor número de hojas ($P<0,01$) indicando la presencia de sobredominancia para las dos variables.

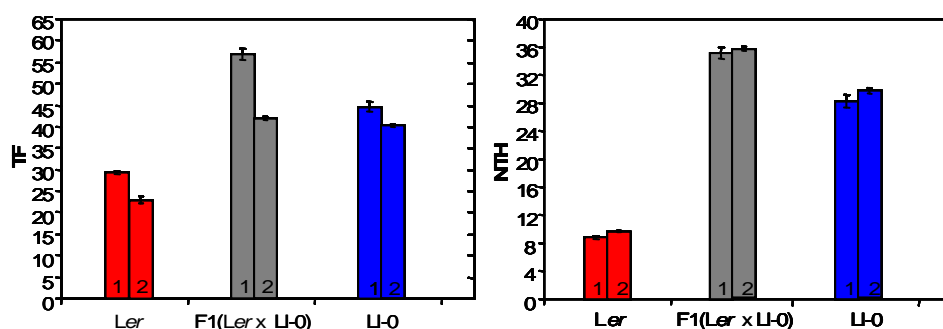


Figura 10. Comportamiento de floración de híbridos F_1 (Ler x LI-0).

Las barras representan la media \pm EE de 15-20 plantas por genotipo para el NTH (izquierda) y para el TF (derecha). Los subíndices dentro de las barras indican cada uno de los experimentos realizados. Las plantas se cultivaron en condiciones de DL.

A partir de una única planta F_1 se generó una progenie F_2 de 148 plantas mediante autofecundación. Cada una de las plantas F_2 se autofecundó por el procedimiento del descendiente de una única semilla hasta la generación F_8 (ver **Materiales y Métodos**).

1.3 Construcción del mapa de ligamiento de la población de RILs Ler/LI-0

Para la construcción del mapa Ler/LI-0 se analizaron las 148 líneas originales de la población de RILs junto a plantas parentales y F_1 . Para ello se extrajo el DNA genómico de cada planta F_8 (ver **Materiales y Métodos**). La selección de los marcadores polimórficos se hizo en dos fases. Inicialmente, para cada cromosoma de *arabidopsis* se seleccionaron marcadores moleculares aproximadamente equidistantes a 1,5 Mb de distancia física a partir de las bases de datos disponibles (<http://www.arabidopsis.org/cereon/>; <http://www.arabidopsis.org>). Así en un primer análisis se identificaron 43 microsatélites (SSLPs) y 37 INDELs polimórficos entre Ler y LI-0 (**Tablas 3 y 4 de Materiales y Métodos**). Entre ellos se incluyeron 2 marcadores INDEL de los genes *FRI* y *FLC* (Johanson y col., 2000; Caicedo y col., 2004).

Posteriormente se diseñaron 14 nuevos marcadores de tipo CAPS en las regiones genómicas de 2 o más Mb de longitud dónde previamente no se había encontrado ningún marcador (ver **Tabla 5 de Materiales y Métodos**). Estas regiones coincidieron principalmente con las zonas centroméricas o pericentroméricas de cada cromosoma

La distancia física media final entre marcadores adyacentes fue de 1,3 Mb, con un mínimo de 0,2 Mb (T20K9-7/F26B6 en el cromosoma 2) y un máximo de 2,7 (MN5-10/T26D22-43 en el cromosoma 5). Sólo en 4 casos la distancia entre marcadores adyacentes excedió de las 2 Mb (en el cromosoma 3 entre MN3-12/MN3-15 y en el cromosoma 5 entre MN5-10/T26D22, JV65/66/CIW10 y CIW10/K8K14). La cobertura física alcanzada por los 95 marcadores seleccionados fue de 116,6 Mb lo que corresponde al 97,9% del genoma de *arabidopsis*.

Para construir el mapa genético Ler/LI-0 se obtuvo la matriz de datos genotípicos de los 95 marcadores analizados en las 148 RILs. En ésta, sólo faltaron el 0,14% de los datos genotípicos debido a ausencia de amplificación del producto de PCR o la interpretación ambigua de las bandas obtenidas en el gel. El análisis de esta matriz mostró que ocho de las líneas eran parentales (3 Ler y 5 LI-0) y otras dos eran genéticamente idénticas por lo que fueron descartadas de la colección y de los análisis posteriores. La población de RILs quedó finalmente constituida por un total de 139 líneas.

Para la construcción del mapa genético se utilizó el programa Joinmap que calcula las frecuencias de recombinación (FR) y los valores LOD entre todos los pares de marcadores. Los 95 marcadores se agruparon en 5 grupos del ligamiento (GL) con un valor LOD mínimo de 3 y este agrupamiento se mantuvo hasta un valor LOD máximo de 9. Tal como se esperaba según las secuencias genómicas de *arabidopsis* de las bases de datos, los 5 GLs correspondieron a cada uno de los 5 cromosomas que forman el complemento haploide de esta especie.

El mapa genético de cada GL se obtuvo utilizando como umbrales los valores de frecuencia de recombinación de 0,35 y de LOD asociados de 2 (ver **Materiales y Métodos**).

La longitud total del mapa genético obtenido fue de 455 cM (**Figura 11**) con una distancia media entre marcadores adyacentes de 5 cM, una distancia mínima de 0,001 cM (MN2-3/F24C20, GL2) y una distancia máxima de 15,7 cM (nga139/nga76, GL5). El tamaño genético de los 5 GLs fue proporcional al tamaño físico de los correspondientes cromosomas aunque contrariamente a los tamaños físicos, el GL5 fue ligeramente mayor que el GL1. Dentro de cada GL el orden genético de casi todos los marcadores coincidió con el orden físico descrito en las bases de datos, excepto para los marcadores ICE10 y F7A19 (GL1) que presentaron un orden inverso respecto al mapa físico. El análisis de los 95 marcadores en las 139 líneas recombinantes detectó un total de 1164 eventos de recombinación que corresponden a un número medio de 8,37 por RIL y un rango que osciló entre dos y 18 recombinaciones por línea. Para cada cromosoma se identificaron entre 0 y 7 recombinaciones por línea y una media de 1,66.

La segregación de cada marcador del mapa genético se analizó mediante el estudio de la proporción de las dos clases homocigotas Ler y LI-0 y la proporción de heterocigotos observada en la generación F_8 de las RILs (0,78%).

Mediante tests de chi-cuadrado se establecieron valores umbrales de proporción de homocigotos 0,39:0,61 para un valor de $P < 0,01$ que corresponden a una proporción 1:1,6.

Como se muestra en la **Figura 12** un total de 9 marcadores presentaron distorsión por encima de estos valores.

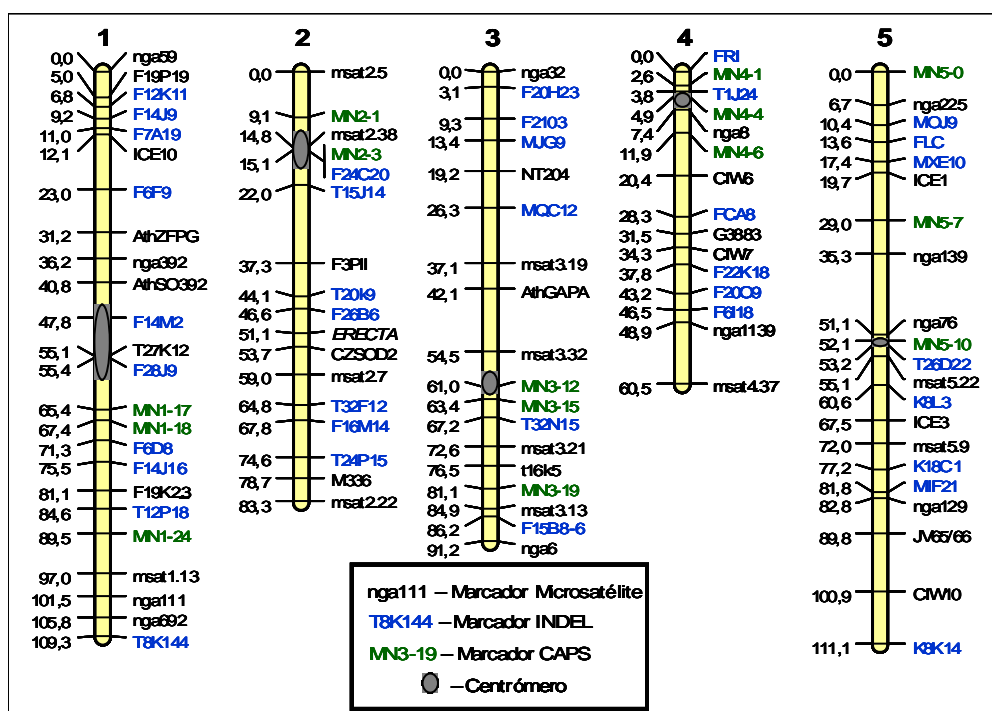


Figura 11. Mapa genético de la población de RILs Ler/LI-0

Las barras amarillas representan los 5 cromosomas de *Arabidopsis*. Las líneas horizontales representan la localización de cada marcador. El nombre de cada marcador aparece a la derecha de los cromosomas y sus respectivas posiciones genéticas (en cM) se indican a la izquierda de éstos.

Ocho de los marcadores distorsionados presentaron un exceso de homocigotos LI-0 y se localizaron en el cromosoma 1 (desde el F6D8 hasta nga692) y sólo uno presentó exceso de homocigotos Ler (marcador CIW10 del cromosoma 5).

El porcentaje de heterocigotos esperados en F_8 es 0,78% y se estimó 2,25% como valor umbral para un exceso de heterocigotos con una $P < 0,01$. Como se muestra en la **Figura 13**, sólo 2 marcadores localizados en el cromosoma 5 (MN5-10 y CIW10) en posiciones no adyacentes mostraron un exceso significativo de heterocigotos.

Con el propósito de determinar la relación entre las distancias genética y física en el mapa genético de la población Ler/LI-0 se estimó la longitud de DNA (kb) por unidad de mapa (cM) en cada intervalo definido por marcadores adyacentes (**Figura 14**). La longitud media en todo el genoma fue de 258 kb/cM valor muy cercano al de 264 kb/cM calculado según los mapas consenso en las bases de datos (AGI, 2000). La comparación de los valores de cada intervalo con la media del genoma de esta población permitió identificar regiones genómicas con valores mayores y menores, los cuales correspondieron a regiones con baja y alta FR respectivamente (**Figura 14A**). Entre las primeras se encuentran las zonas centroméricas de los 5 cromosomas (**Figura 14A y B**) que muestran valores de 1,1 Mb/cM (centrómero del cromosoma 3) hasta 6,5 Mb/cM (centrómero del cromosoma 1). Estas regiones mostraron la FR más baja observada en el mapa genético, si bien además se identificaron otras regiones con valores de FR reducidos pero menos extremos. Estas últimas se localizan en dos intervalos contiguos en el brazo superior del cromosoma 1, en dos intervalos muy distantes del cromosoma 4 y en un intervalo en la mitad del brazo inferior del cromosoma 5 (**Figura 14A y B**). Las regiones con alta FR mostraron relaciones kb/cM hasta 5 veces menores que la media y se distribuyeron en los 5 cromosomas. Aunque estas regiones no se localizaron siguiendo un patrón común dentro de

los cromosomas, parecen localizarse principalmente en las regiones pericentroméricas y subteloméricas (**Figura 14 A y B**).

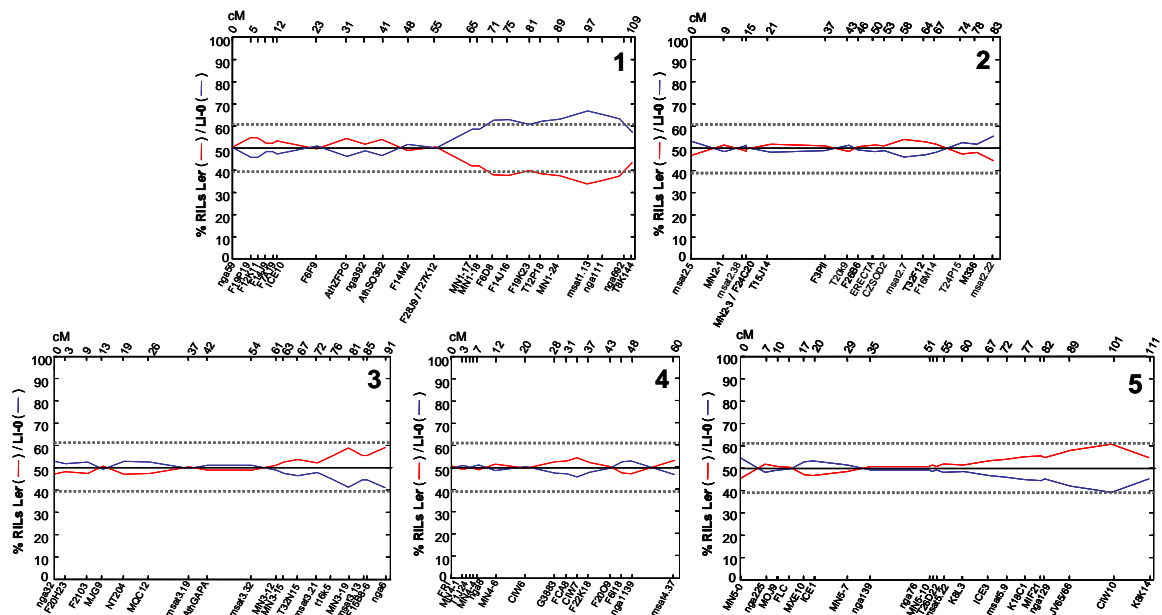


Figura 12. Distorsión de la segregación de homocigotos en la población de RILs Ler/LI-0

En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de RILs homocigotas Ler (en color rojo) y LI-0 (en color azul) para cada uno de los marcadores ordenados según el mapa genético establecido (eje de abscisas). En el eje superior de abscisas se muestra la posición genética (cM) de los marcadores. La línea horizontal continua muestra el porcentaje esperado (50%) de ambos genotipos en ausencia de distorsión. Las líneas de puntos superior e inferior representan los umbrales del 61% y del 39% por encima de los cuales la segregación es significativamente distinta de la esperada ($P < 0,01$). Los números en la esquina superior derecha de cada gráfico indican los cromosomas de arabidopsis.

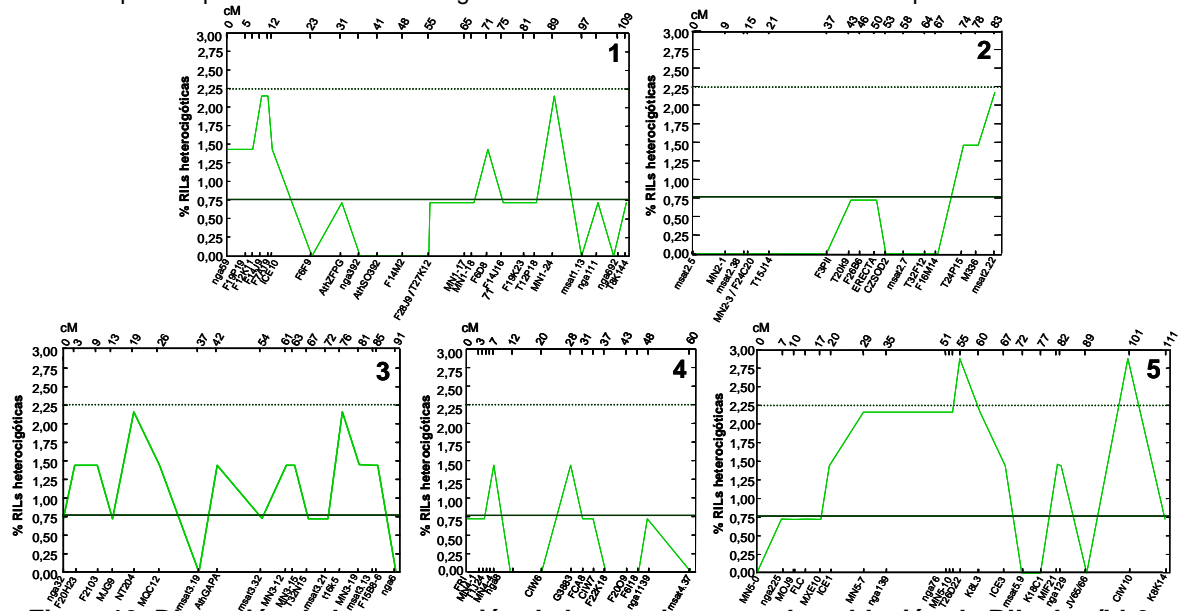


Figura 13. Distorsión de la segregación de heterocigotos en la población de RILs Ler/LI-0.

En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de heterocigotos para cada uno de los marcadores ordenados según el mapa genético establecido (eje de abscisas). En el eje superior de abscisas se muestra la posición genética (cM) de los marcadores. La línea horizontal continua muestra el porcentaje esperado (0,78%) de heterocigotos en ausencia de distorsión. La línea de puntos superior representa el umbral del 2,25% por encima del cual la proporción de heterocigotos observada es significativamente distinta de la esperada ($P < 0,01$). Los números en la esquina superior derecha de cada gráfico indican los cromosomas de arabidopsis.

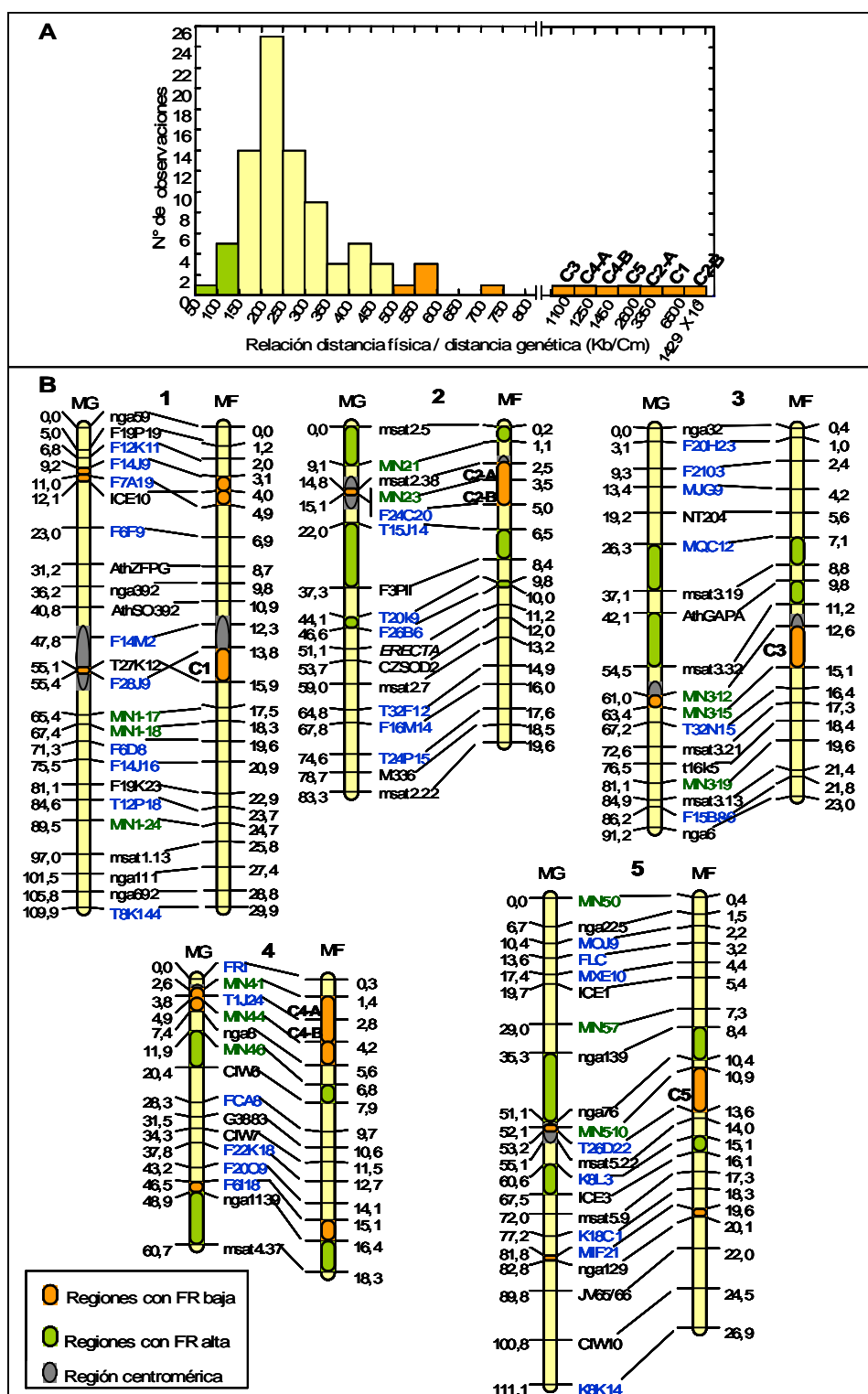


Figura 14. Comparación de las distancias genéticas y físicas en el mapa genético Ler/LI-0.

A. Distribución de la razón distancia física/distancia genética (kb/cM) en los intervalos definidos por los 95 marcadores. En color amarillo se representan los valores que no difieren significativamente del valor medio del genoma en la población Ler/LI-0 (258 kb/cM). En color verde se representan los valores significativamente inferiores a la media mientras que en color naranja se representan los valores significativamente superiores. **B.** Distribución de la relación distancia física/ distancia genética en cada cromosoma. Las barras verticales representan los 5 cromosomas de *Arabidopsis* mostrándose en cada uno de ellos los mapas genéticos (MG) y físicos (MF). Las posiciones de los marcadores se muestran en cM y kb respectivamente.

1.4 Análisis del tiempo de floración en la población de RILs Ler/LI-0

Para determinar la base genética de las diferencias de tiempo de floración y de respuesta a la vernalización entre Ler y LI-0, se analizó el fenotipo de las 139 RILs de la población Ler/LI-0 junto con las accesiones parentales y el híbrido F₁. Este análisis se realizó en tres condiciones ambientales distintas: sin vernalización (NV), con un tratamiento de vernalización de 3 meses a 5°C en condiciones de fotoperiodo largo (VDL) y con un tratamiento de vernalización similar pero en condiciones de fotoperiodo corto (VDC). La exposición al tratamiento de vernalización se realizó en el estadio de plántulas recién germinadas. Las plantas no vernalizadas se cultivaron en cuatro bloques aleatorios de 2-10 plantas de cada RIL por bloque mientras que los realizados en VDL y VDC se organizaron en dos bloques con 4-8 plantas de cada genotipo por bloque (ver **Materiales y Métodos**). El experimento en VDC tuvo una mortalidad alta y únicamente se obtuvieron datos para 102 líneas (1-5 plantas por línea). Las plántulas no vernalizadas se plantaron tres días después de que finalizaron los tratamientos de vernalización, por lo que todas las plantas vernalizadas y no vernalizadas se cultivaron simultáneamente en invernadero en condiciones de día largo (ver **Materiales y Métodos**). Para cada planta se cuantificó el tiempo de floración de dos formas: como el número de días transcurridos desde que finalizó el tratamiento de vernalización hasta que se detectó visualmente la yema floral (TABF) y hasta la apertura de la primera flor (TF). También se cuantificó el número total de hojas (NTH) producido por cada planta y sus componentes número de hojas de roseta (NHR) y número de hojas caulinares (NHC). Posteriormente para cada genotipo se calculó la media de cada una de las cinco variables relacionadas con la floración (TABF, TF, NTH, NHR, NHC) en las tres condiciones ambientales descritas.

En la **Figura 15** se muestran las distribuciones de frecuencias del TF y NTH en la población de RILs para todas las condiciones ambientales analizadas. Las heredabilidades en sentido amplio variaron entre el 28% el 87% dependiendo del carácter y el ambiente (**Tabla 11**). En condiciones NV las distribuciones del TF y del NTH no se ajustaron a una distribución normal. Las medias de TF y el NTH de las RILs presentaron un rango de variación entre 27-110 días y 4-50 hojas encontrándose numerosas líneas transgresivas en ambos sentidos lo que indica la presencia de alelos que incrementan y reducen el fenotipo correspondiente en los dos parentales (**Figura 15**). La comparación de los fenotipos de floración entre el ambiente sin vernalización y cada uno de los vernalizados proporciona una estima de la respuesta a la vernalización de las RILs. Tanto en condiciones de VDL como de VDC se produjo aceleración de la floración y a diferencia de NV el parental LI-0 floreció antes que Ler. Se observó una mayor aceleración de la floración en VDL que en VDC de ambos parentales y de las RILs cuya media global y rango de variación fue menor en VDL que en VDC (ver **Tabla 11**). Las distribuciones de las demás variables analizadas (NHR, NHC y TABF) mostraron las mismas tendencias que las descritas para TF y NTH (**Tabla 11**).

Los análisis estadísticos de las distribuciones de frecuencias en los distintos ambientes mostraron la presencia de interacción genotipo x ambiente (G x A) altamente significativa ($P < 0,0001$). Este resultado indica la presencia de variación alélica cuyo efecto se expresa de forma diferencial en los ambientes analizados.

Las correlaciones de las variables TF y NTH entre el tratamiento sin vernalización y cada uno de los tratamientos vernalizados fueron altamente significativas ($0,40 > r > 0,58$; $P < 0,001$) (**Figura 16**). Por lo tanto, la base genética de la variación fenotípica observada en los 3 ambientes analizados presenta elementos comunes.

Finalmente se estimó la correlación entre las variables TF y NTH en los tres ambientes. Como se muestra en la **Figura 17**, estas correlaciones oscilaron entre 0,36 y 0,97 ($P < 0,001$), sugiriendo que la mayor parte de la variación para TF y NTH está bajo el mismo control genético.

1.5 Análisis de QTLs en la población de RILs Ler/LI-0

Con objeto de identificar y localizar las regiones cromosómicas responsables de las diferencias de floración entre Ler y LI-0, se utilizaron los valores fenotípicos de las 139 RILs en las 3

condiciones ambientales para análisis de QTLs. Además de las 5 variables medidas directamente (TF, NTH, NHR, NHC y TABF) en cada ambiente (NV, VDL y VDC) también se analizó una variable derivada obtenida como la razón entre el TF y el NTH (TF/NTH) que mide el tiempo medio de desarrollo de una hoja. El análisis de QTLs se realizó utilizando el método del mapeo de múltiples QTLs (MQM) (ver **Materiales y Métodos**) considerándose como QTLs verdaderos aquellos detectados con valor de LOD mayor que el umbral genómico (2,5-2,6), y como QTLs putativos aquellos detectados por debajo de este umbral pero por encima del umbral cromosómico (1,7-2,0; ver **Tabla 9**).

La **Tabla 12** y las **Figuras 18** y **19** muestran los QTLs identificados en los tres ambientes. Para cada carácter medido directamente (TF, NTH, NHR, NHC y TABF) y también para la variable derivada se identificaron entre 2 y 6 QTLs, localizados en todos los cromosomas excepto el cromosoma 3.

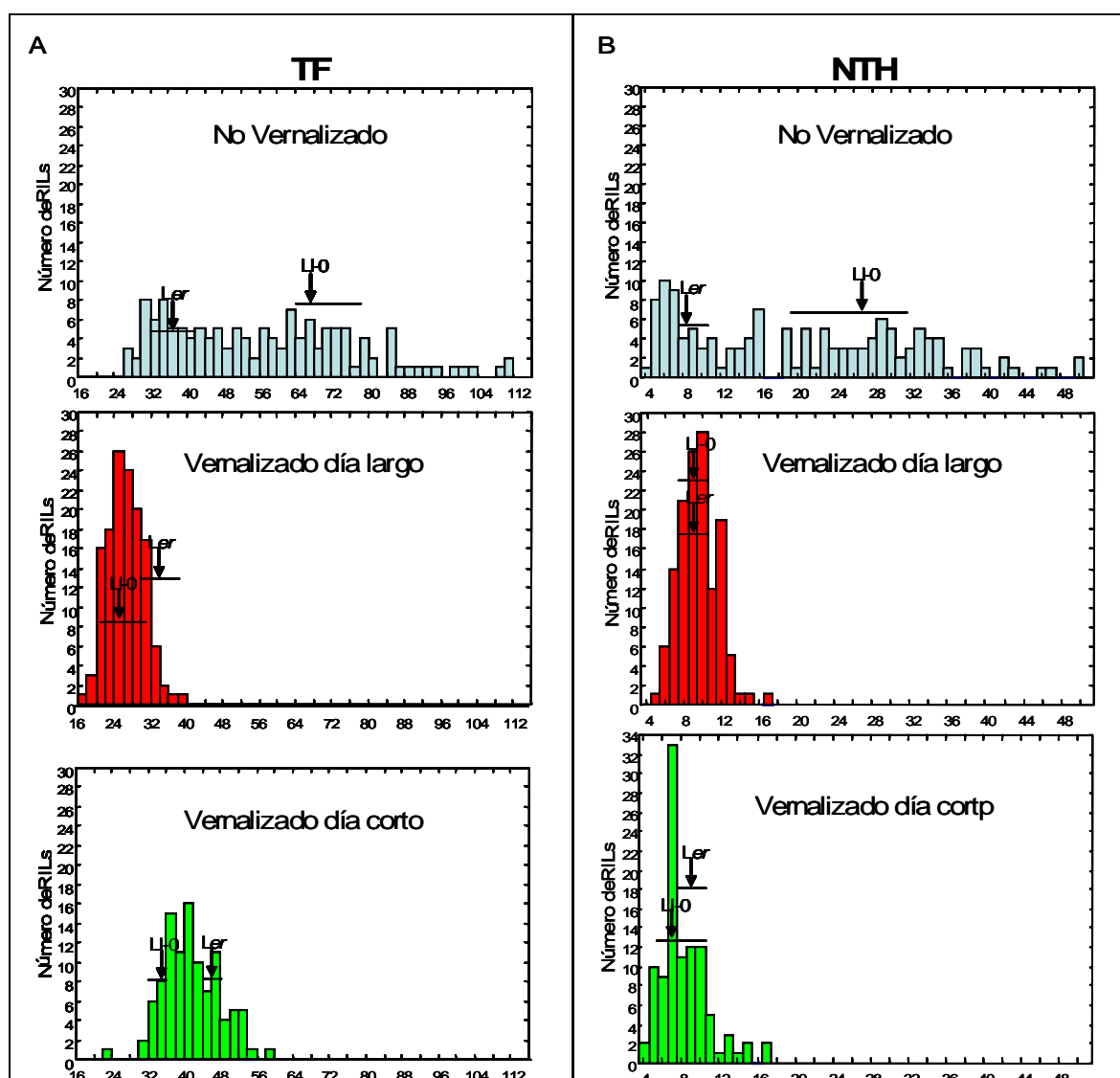


Figura 15. Distribuciones de frecuencias del TF y NTH en la población de RILs Ler/LI-0.

La población de RILs se cultivó en 3 ambientes: no vernalizado (paneles superiores), con vernalización en día largo (paneles medios) y con vernalización en día corto (paneles inferiores). Las flechas corresponden al valor medio de los parentales (10-20 plantas por parental) y la barra horizontal representa sus rangos de variación.

	NV	VDL	VDC
Tiempo de Floración (TF)			
Ler	29,2±1,3	34,1±4,5	46,5±0,7
LI-0	44,6±5,3	25,7±3,5	37,0±1,5
F ₁ Ler x LI-0	56,8±4,7	-	-
Media RILs	57,1±20,4	26,6±4,0	42,0±6,2
Mn-Max (RILs)	27,2-110,4	28,8-39,1	23,0-58,5
Heredabilidad (h^2)	0,87	0,28	0,59
Número Total de Hojas (NTH)			
Ler	8,7±0,4	8,9±1,3	9,0±1,4
LI-0	27,0±1,7	8,8±1,2	6,7±0,5
F ₁ Ler x LI-0	35,3±2,9	-	-
Media RILs	21,4±12,0	10,0±2,0	8,4±2,6
Mn-Max (RILs)	5,0-50,1	5,0-17,6	4,0-17,0
Heredabilidad (h^2)	0,88	0,58	0,59
Número de Hojas de Roseta (NHR)			
Ler	6,8±0,1	6,3±1,1	6,5±0,7
LI-0	20,0±0,8	5,6±0,7	4,2±0,4
F ₁ Ler x LI-0	27,5±2,8	-	-
Media RILs	16,7±9,7	6,8±1,4	6,0±2,2
Mn-Max (RILs)	3,3-40,7	3,0-12,0	3,0-14,0
Heredabilidad (h^2)	0,86	0,56	0,63
Número de Hojas Caulinares (NHC)			
Ler	1,9±0,3	2,6±0,5	2,5±0,7
LI-0	6,9±1,3	3,1±0,8	2,5±0,5
F ₁ Ler x LI-0	7,7±0,9	-	-
Media RILs	4,7±2,4	3,2±0,7	2,3±0,6
Mn-Max (RILs)	6,1-10,0	1,0-5,5	1,0-4,0
Heredabilidad (h^2)	0,77	0,30	0,39
Tiempo de Aparición del Botón Floral (TABF)			
Ler	29,8±3,1	23,1±3,0	38,5±2,1
LI-0	60,2±3,9	17,1±3,1	29,0±2,7
F ₁ Ler x LI-0	54,2±4,3	-	-
Media RILs	50,2±21,2	18,2±3,3	34,0±6,1
Mn-Max (RILs)	20,2-104,7	9,9-28,6	23,0-51,5
Heredabilidad (h^2)	0,88	0,42	0,59

Tabla 11. Parámetros estadísticos de los caracteres de floración de la población de RILs Ler/LI-0.

La población de RILs se cultivó en 3 ambientes: no vernalizado (NV), con vernalización en día largo (VDL) y con vernalización en día corto (VDC). Las variables de tiempo se midieron en días. Los valores corresponden a la media ± EE de 20-30 plantas en las condiciones de NV, y 1-10 plantas en VDL y VDC.

En todos los caracteres se identificó un mayor número de QTLs en el tratamiento NV que en las dos condiciones de vernalización VDL y VDC. La varianza total explicada por los QTLs identificados osciló entre el 17% para el TF/NTH en VDL y el 82% para NTH y NHR en condiciones NV. Igualmente, para todas las variables los QTLs identificados explicaron mayor porcentaje de varianza fenotípica en el tratamiento sin vernalización que en los dos tratamientos con vernalización. De forma general los QTLs detectados explican mayor porcentaje de varianza para NTH, NHR, TF y TABF y menor para la variable derivada (TF/NTH). El porcentaje de varianza explicado por los QTLs individuales osciló entre el 2% para el TF, NTH y NHR en condiciones de NV (marcador F12K11) y el 31% para el TF/NTH en el mismo ambiente (marcador *FR1*). El mapeo de QTLs para el TF y el NTH, que son las dos variables más relevantes analizadas, identificó un total de 6 QTLs responsables de cada carácter en el ambiente (NV) (**Figura 19**). Para ambos caracteres, sólo el QTL identificado en

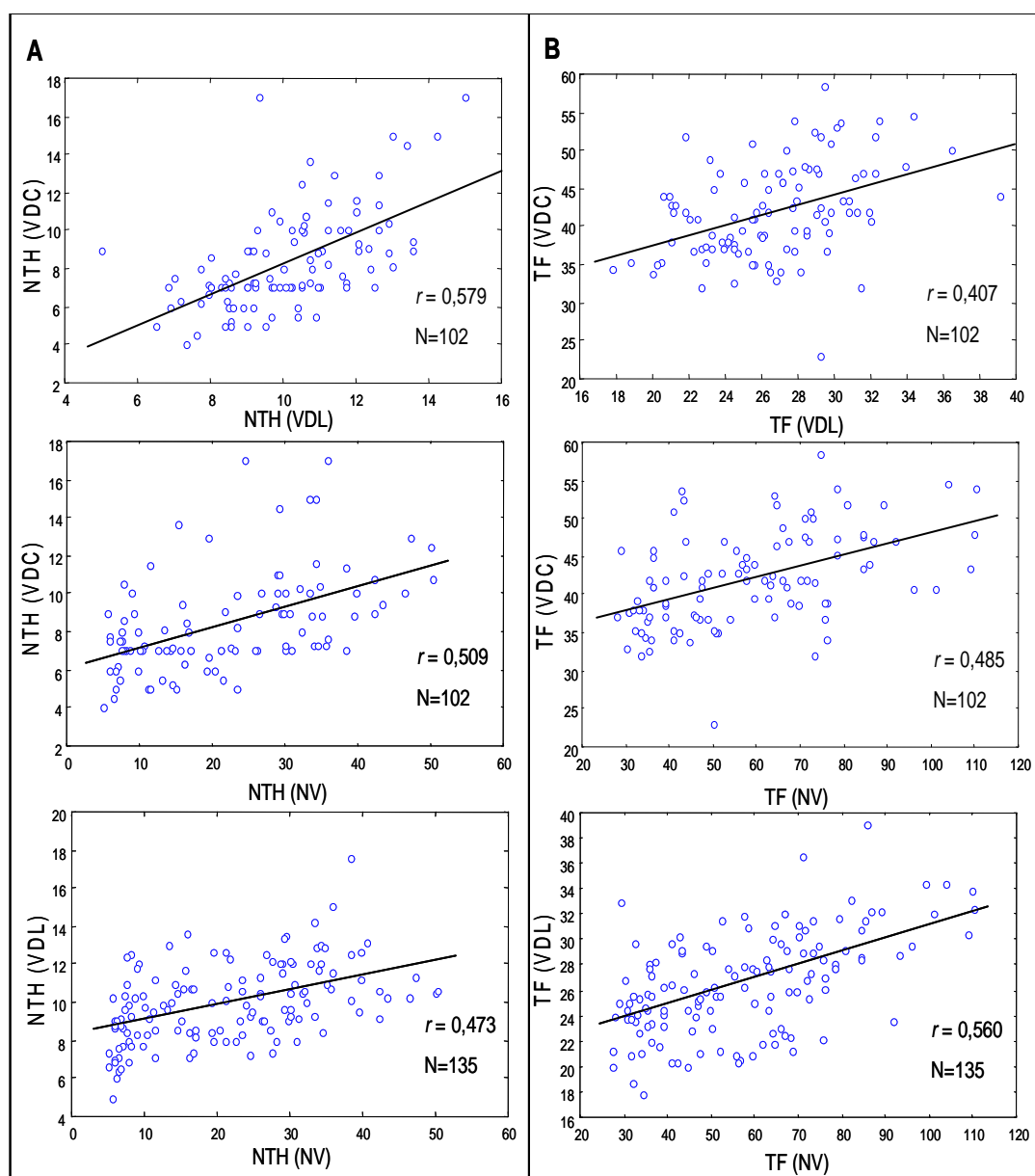


Figura 16. A y B. Correlaciones de NTH (A) y TF (B) entre los distintos ambientes.

En cada gráfico se indican las condiciones ambientales que se analiza en la correlación (NV:sin vernalización; VDL: vernalización en día largo; VDC: vernalización en día corto); $P < 0.0001$ en todos los casos.

condiciones NV, ligado al marcador *FRI* y localizado en el cromosoma 4 presentó un efecto mayor ya que supera el 20% de varianza explicada, mientras que los QTLs ligados a los marcadores *FLC* y *nga139* localizados en el cromosoma 5, se consideraron de efecto moderado puesto que cada uno de ellos explicaron entre 10%-20% de la varianza fenotípica. Los otros 3 QTLs ligados a los marcadores *F12K11*, *F6I18* y *CIW10* y localizados en los cromosomas 1, 4 y 5 respectivamente, se consideraron QTLs de efecto menor ya que explicaron menos del 10% de varianza fenotípica

Los intervalos de confianza de los QTLs detectados para la mayoría de los caracteres solaparon considerablemente, indicando que probablemente corresponden a los mismos loci, que tienen efectos pleiotrópicos sobre los distintos caracteres.

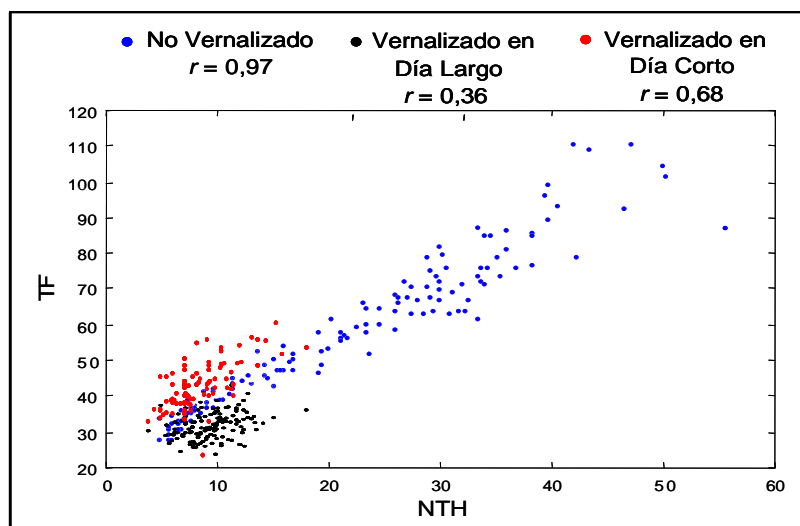


Figura 17. Correlación entre TF y NTH en la población de RILs Ler/LI-0

r: coeficiente de correlación de Pearson en cada ambiente

Con el fin de determinar si existían interacciones significativas entre los QTLs responsables de la variación de cada carácter en los tres ambientes, se analizaron todas las interacciones entre los loci identificados tomados dos a dos (ver **Materiales y Métodos** y **Tabla 12**). De esta forma se identificaron de uno a cinco pares de interacciones QTL X QTL por carácter. Todas ellas excepto una implicaron a los QTLs de mayor efecto ligados a los marcadores *FRI*, *FLC* y *nga139* (**Tabla 12**). Para el TF y el NTH se detectó la interacción significativa entre los QTLs ligados a *FLC* y *nga139*. Además para NTH pero no para TF se identificó otra posible interacción ($P=0,09$) entre *FLC* y uno de los loci de efecto menor (*F6I18*). Como se muestra en la **Figura 20** las mayores interacciones se detectaron para la variable derivada TF/NTH donde las interacciones entre los tres QTLs de mayor efecto explican del 16% al 23% de la varianza fenotípica (**Tabla 12**). Sin embargo estas interacciones explicaron menos del 5% de la varianza fenotípica para cada uno de los caracteres TF y NTH, sugiriendo que estos QTLs tienen un efecto cuantitativamente diferencial sobre TF y NTH, y que podrían afectar conjuntamente al plastocrono o velocidad de desarrollo de los primordios. Para determinar las bases genéticas de la respuesta diferente a la vernalización de Ler y LI-0 se comparó el mapeo de QTLs identificados sin vernalización, con el obtenido en los ambientes vernalizados (**Tabla 12** y **Figuras 18** y **19**). En los ambientes vernalizados el número de QTLs detectados y el efecto de los mismos fue menor que el obtenido sin vernalización, en concordancia con la menor variación fenotípica observada en la población en estos ambientes. Así para TF y NTH se detectaron 2 QTLs comunes de efectos moderados en VDL y VDC localizados en el cromosoma 5 (ligados a *FLC* y *CIW10*) y también detectados en ausencia de vernalización. Además se identificó un tercer QTL específico de VDL y de efecto menor, situado en el brazo

largo del cromosoma 2. Estos tres QTLs en conjunto explicaron el 36% y 50% del TF y NTH respectivamente en VDL y los dos QTLs explicaron el 32% y 43% en VDC.

Carácter	QTL	GL	NV				VDL				VDC				QTL x A
			LOD	INT	%VAR	EA	LOD	INT	%VAR	EA	LOD	INT	%VAR	EA	
TF			79,0				35,8				31,6				
	F12K11	1-6,8	2,6	0,0-18,1	1,9	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T32F12	2-64,8	-	-	-	-	2,3	47,1-83,2	5,2	0,9	-	-	-	-	-
	<i>FR</i>	4-0,0	23,9	0,0-1,5	25,4	-10,6	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	F618	4-46,5	3,7	25,4-56,9	2,7	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i>	5-13,6	17,2	11,4-17,1	16,1	-9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	MXE10	5-17,4	-	-	-	-	5,5	13,6-25,7	13,2	-1,4	5,2	7,7-27,7	18,0	-2,7	*
	nga139	5-35,3	11,5	23,2-42,8	9,8	-7,8	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	CIW10	5-100,9	4,4	85,8-111,1	3,3	3,9	5,0	93,3-111,1	11,9	1,5	4,0	86,8-111,1	13,5	2,4	-
	<i>FLC</i> X <i>nga139</i>		P=0,08				-	-	-	-	-	-	-	-	
NTH			81,4				49,6				43,2				
	F12K11	1-6,8	3,0	0,0-14,1	1,9	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>msat2,7</i>	2-59,0	-	-	-	-	2,8	39,3-68,8	5,4	0,5	-	-	-	-	-
	<i>FR</i>	4-0,0	25,8	0,0-1,5	25,1	-6,2	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	F618	4-46,5	4,2	30,8-52,9	2,7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i>	5-13,6	18,9	11,9-16,6	16,2	-5,3	8,5	9,7-19,7	17,0	-0,8	-	-	-	-	*
	ICE1	5-19,4	-	-	-	-	-	-	-	-	6,8	11,4-34,0	20,1	-1,2	*
	nga139	5-35,3	14,4	25,7-41,8	11,4	-4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	CIW10	5-100,9	4,5	81,8-111,1	3,0	2,2	11,4	93,8-110,9	23,8	1,0	7,4	91,3-109,9	22,4	1,3	-
	F618 X <i>FLC</i>		P=0,09				-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>FLC</i> X <i>nga139</i>		P=0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	
NHR			81,2				51,7				41,8				
	F12K11	1-6,8	3,1	0,0-12,1	2,0	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>msat2,7</i>	2-59,0	-	-	-	-	2,9	45,6-68,8	5,0	0,3	-	-	-	-	-
	<i>FR</i>	4-0,0	26,3	0,0-1,5	26,2	-5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	F618	4-46,5	4,8	32,5-51,9	3,2	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i>	5-13,6	17,4	11,9-16,6	17,7	-4,1	7,2	9,7-26,2	13,4	-0,5	-	-	-	-	*
	ICE1	5-19,4	-	-	-	-	-	-	-	-	6,6	12,4-32,5	20,1	-1,0	*
	nga139	5-35,3	14,3	29,0-42,3	11,4	-3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	CIW10	5-100,9	5,2	83,8-111,1	3,6	1,9	13,8	95,3-111,1	29,1	0,8	6,9	91,8-108,9	21,1	1,0	-
	F12K11 X <i>msat2,7</i>		P=0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	
	F12K11 X <i>FR</i>		P=0,05				-	-	-	-	-	-	-	-	
	F618 X ICE1		P=0,09				-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>FLC</i> X <i>nga139</i>		P=0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	
	ICE1 X CIW10		-	-	-	-	-	-	-	-	P=0,08				3,2
NHC			72,6				35,5				39,8				
	F14M2	1-47,7	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	43,2-54,2	13,3	0,2	-
	<i>FR</i>	4-0,0	15,6	0,0-2,6	18,6	-1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	CIW7	4-34,3	-	-	-	-	3,2	28,3-48,9	7,4	-0,2	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i>	5-13,6	9,5	10,9-19,4	10,2	-1,0	7,3	8,2-23,2	18,2	-0,3	-	-	-	-	*
	MN5-7	5-29,0	11,0	20,2-35,3	12,1	-1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	nga139	5-35,3	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	2,5-44,8	9,5	-0,2	*
	CIW10	5-100,9	-	-	-	-	5,1	73,0-110,4	12,4	0,3	-	-	-	-	-
	K8K14	5-111,1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	83,8-111,1	9,7	0,2	-
	CIW7 X MN5-7		P=0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>FLC</i> X <i>nga139</i>		P=0,00				-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>nga139</i> X K1814		P=0,04				-	-	-	-	-	-	-	-	

Carácter	QTL	GL	NV				VDL				VDC				QTL x A
			LOD	INT	%VAR	EA	LOD	INT	%VAR	EA	LOD	INT	%VAR	EA	
TABF			78,8				30,3				39,5				
	F12K11	1-6,8	2,6	0,0 - 16,6	1,9	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FR</i>	4-0,0	23,7	0,0-1,5	25,4	-11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	F2009	4-43,2	-	-	-	-	2,3	37,3 - 46,2	5,8	0,8	-	-	-	-	-
	F618	4-46,5	3,5	25,4 - 56,9	2,6	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i>	5-13,6	16,7	11,4 - 17,1	15,7	-9,3	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	MXE10	5-17,4	-	-	-	-	2,6	10,4 - 47,3	6,6	-0,9	-	-	-	-	*
	ICE1	5-19,4	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	16,1 - 3,1	18,3	-2,6	*
	nga139	5-35,3	11,9	23,7 - 42,8	10,2	-7,6	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	QW10	5-100,9	4,3	83,8 - 111,1	3,3	4,0	5,5	91,8 - 111,1	14,4	1,3	6,4	91,8 - 108,4	20,2	2,8	-
TF/NTH	F12K11 X <i>FR</i>		<i>P</i> =0,08				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i> X nga139		<i>P</i> =0,09				-	-	-	-	-	-	-	-	-
			67,4				16,7				28,5				
	T32N15	3-67,2	-	-	-	-	3,8	56,7 - 2,2	11,4	0,22	-	-	-	-	-
	<i>FR</i>	4-0,0	20,4	0,0-2,0	31,5	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	<i>FLC</i>	5-13,6	7,3	10,4 - 28,2	8,8	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	*
	nga139	5-35,3	10,6	29,0 - 41,8	13,7	0,44	-	-	-	-	3,2	12,4 - 58,6	11,0	0,38	*
	msat5,9	5-72,0	-	-	-	-	2,8	61,2 - 106,4	8,3	-0,14	-	-	-	-	-
	K8K14	5-111,1	-	-	-	-	-	-	-	-	3,9	89,8 - 111,1	13,5	-0,42	-
	T32N15 X <i>FR</i>		<i>P</i> =0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FR</i> X <i>FLC</i>		<i>P</i> =0,00				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FR</i> X nga139		<i>P</i> =0,00				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FR</i> X K8K14		<i>P</i> =0,03				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>FLC</i> X nga139		<i>P</i> =0,1				-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nga139 X K8K14		<i>P</i> =0,01				-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 12. QTLs de floración de la población de RILs Ler/LI-0.

Para cada carácter y ambiente se muestra: el nombre del marcador más cercano a cada QTL, su localización cromosómica (GL) y su posición genética (en cM), el valor máximo de LOD (LOD), el intervalo de confianza de dos unidades de LOD (INT), el porcentaje de varianza fenotípica explicada (% VAR), el efecto alélico estimado como la diferencia entre las medias de los dos grupos genotípicos homocigóticos de las RILs (EA) (valores positivos implican que los alelos *Ler* incrementan los valores fenotípicos y valores negativos lo reducen). Para cada carácter, el valor en negrita mostrado en la parte superior de la columna % de varianza indica el porcentaje total de varianza explicado por los efectos aditivos de los QTLs identificados para ese carácter. Los QTLs que muestran interacción significativa con el ambiente se indican en la última columna con el símbolo * ($P < 0,05$). Las interacciones no significativas se muestran como -. Las interacciones QTL x A fueron analizadas entre el ambiente sin vernalización y el ambiente VDL. Las interacciones QTL x QTL detectadas para cada carácter se muestran en la parte inferior de cada carácter, indicando la probabilidad y la varianza explicada de cada una de ellas.

Para el resto de caracteres se obtuvieron resultados similares, detectándose dos o tres QTLs por carácter que explican entre el 17% y el 40% dependiendo del ambiente vernalizado y el carácter. Los dos QTLs del cromosoma 5, se detectaron en la mayoría de los análisis indicando nuevamente que estas regiones afectan pleiotrópicamente a los distintos caracteres. Sin embargo también se identificaron otros tres QTLs de efecto pequeño, dos QTLs específicos de NHC en el cromosoma 4 (en VDL) y el cromosoma 1 (en VDC) y otro específico de la variable TF/NTH en el cromosoma 3 (ver **Tabla 12**).

En lo que respecta a la interacción de cada QTL con el ambiente (**Tabla 12, Materiales y Métodos**), los cuatro QTLs de mayor efecto situados en los cromosomas 4 y 5, mostraron interacciones significativas lo que no se observó para los QTLs de efecto menor. El QTL del cromosoma 4 sólo se detecta en el ambiente no vernalizado, mientras que los QTLs del cromosoma 5 se detectan en todos los ambientes pero con efecto diferente. La región genómica situada entre *FLC* y nga139 presenta mayor efecto cuando no hay vernalización y su efecto se reduce cuando hay vernalización. En ambos loci el alelo de LI-0 retrasa la floración y su efecto se reduce por el tratamiento de vernalización. Por el contrario, en el QTL de la parte inferior del cromosoma 5 el alelo de LI-0 acelera la floración en comparación con el alelo *Ler* y tiene mayor efecto cuando hay vernalización. Además interesantemente otro QTL en el cromosoma 2 que afecta a TF y NTH de forma similar al QTL de la parte inferior del

cromosoma 5, ya que los alelos LI-0 aceleran la floración de forma significativa únicamente en condiciones de VDL.

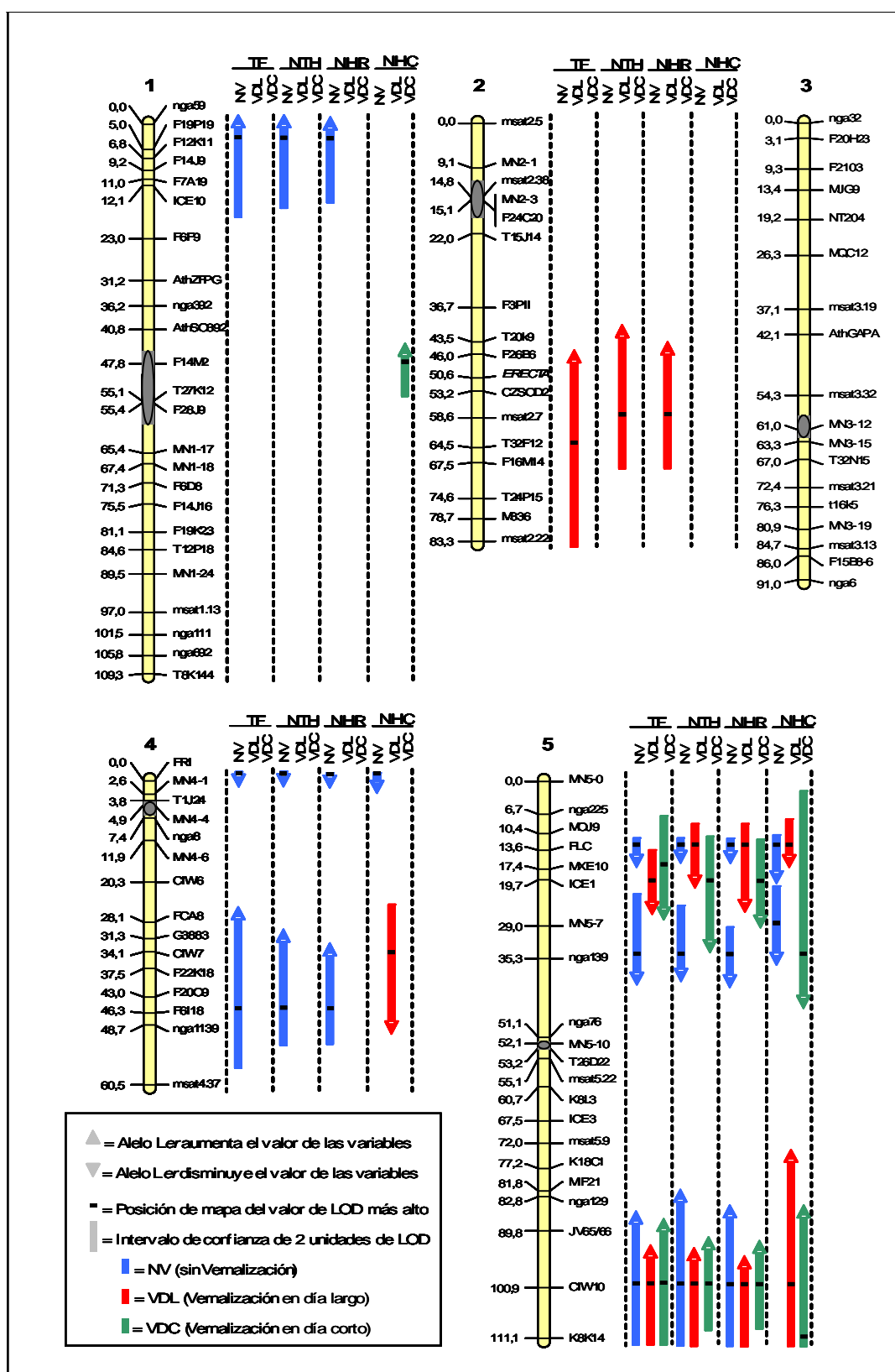


Figura 18. Mapeo de QTLs de floración en la población de RILs Ler/LI-0. Los QTLs detectados para cada carácter (TF, NTH, NHR y NHC) en el ambiente sin vernalización (NV) y en los dos ambientes con vernalización (VDL y VDC) se muestran junto a los mapas genéticos de los 5 grupos de ligamiento de la población de RILs Ler/LI-0.

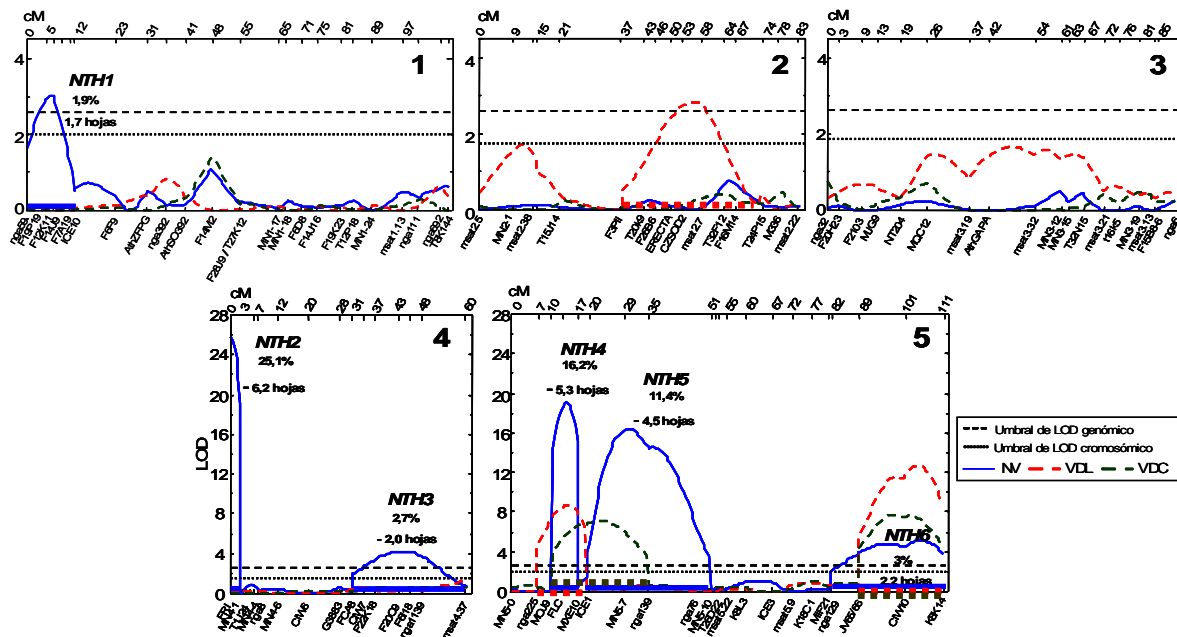


Figura 19. Perfiles de LOD para el número total de hojas (NTH).

En el eje de ordenadas se representan el valor de LOD estimado para el NTH en condiciones sin vernalización (NV), con vernalización en Día Largo (VDL) y con vernalización en Día Corto (VDC). En el eje de abscisas se muestran los mapas genéticos en cM, indicando en la esquina superior derecha de cada panel el grupo de ligamiento al que corresponde. Para cada QTL se representan los intervalos de confianza de 2 unidades de LOD. Junto a cada QTL identificado en condiciones de NV (NTH1 hasta NTH6) se indica el porcentaje de varianza explicado y su efecto alélico aditivo. Las 2 líneas horizontales en cada mapa indican los umbrales de LODs cromosómicos y genómico calculados a una probabilidad ($P < 0,01$). Los perfiles mostrados se obtuvieron con el modelo de MQM con un cofactor por cada uno de los 6 QTLs.

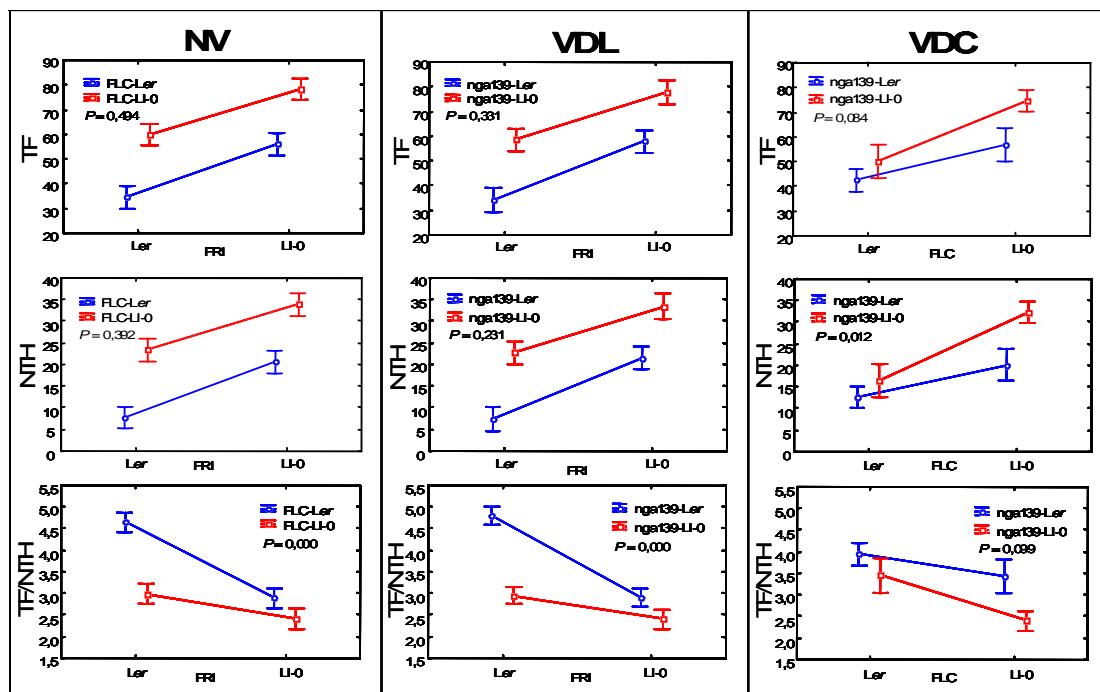


Figura 20. Interacción entre los QTLs de mayor efecto en la población de RILs Ler/LI-0

Cada panel muestra la interacción entre dos QTLs (*FRI*, *FLC* y *nga139*) para los caracteres TF (parte superior), NTH (parte media) y TF/NTH (parte inferior), en cada uno de los 3 ambientes NV, VDL y VDC. Para cada carácter y cada ambiente se representan los valores medios \pm DE de las cuatro clases genotípicas de las RILs clasificadas en base al marcador más cercano a cada uno de los 3 QTLs (*FRI*, *FLC* y *nga139*).

Por lo tanto estos cinco QTLs son los principales responsables de la mayor respuesta a la vernalización de LI-0, ya que en tres de ellos el alelo LI-0 retrasa la floración principalmente en ausencia de vernalización y en los otros dos acelera la floración después del tratamiento de vernalización.

2. Caracterización genética del locus *FAQ3*, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos

2.1 Obtención de líneas de introgresión de *FAQ3*

Como resultado de trabajos previos, en el laboratorio se disponía de tres líneas de introgresión de floración temprana, denominadas LS5, LS11 y LS22, portadoras de tres o cuatro regiones genómicas Shak de entre 2,5 y 12 Mb de longitud varias en fondo genético Ler (**Figura 6A**). La introgresión del cromosoma 3 de Shak en la línea LS11 resultó ser la menor de las tres, con un tamaño de aproximadamente 2.5 Mb mientras que en las otras dos líneas la longitud fue de unas 6 Mb. Con el fin de estudiar el efecto del locus *FAQ3* en el tiempo de floración y realizar un mapeo fino de su posición en el extremo superior del cromosoma 3, se diseñaron cruzamientos para obtener líneas que tuviesen una única introgresión procedente de Shak en esta región. Para ello, cada una de las tres líneas se cruzó con la accesión Ler, utilizando ésta como parental femenino en los tres cruzamientos y se obtuvieron las descendencias F_1 y las poblaciones F_2 correspondientes. A continuación de cada población segregante F_2 se cultivaron de 200 a 240 individuos, y se seleccionaron las plantas portadoras de una única introgresión en el cromosoma 3 (**Figura 6B, Materiales y Métodos**). Para ello se analizaron de uno a tres marcadores moleculares en cada una de las tres-cuatro introgresiones Shak segregantes en las poblaciones derivadas de cada línea (**Tabla 6, Materiales y Métodos**). En la población derivada de la línea LS22 se identificó una sola planta heterocigótica para la introgresión *FAQ3*-Shak denominada LS22-703, mientras que a partir de las otras dos líneas (LS5 y LS11) se identificaron plantas homocigotas para la región cromosómica de *FAQ3*-Shak denominadas LS5-321 y LS11-107.

2.2 Caracterización de *FAQ3*

2.2.1 Efecto del alelo *FAQ3*-Shak

Para determinar el efecto en el tiempo de floración del alelo *FAQ3*-Shak en comparación al alelo *FAQ3*-Ler, se analizó el NTH y el TF de plantas de las dos líneas, portadoras de la región de *FAQ3* Shak en homocigosis (LS11-107 y LS5-321) en condiciones de fotoperiodo de DL y DC. En la **Figura 21** se muestran los datos obtenidos en el invernadero bajo condiciones de DL. El valor medio de NTH de las líneas LS11-107 y LS5-321 fue 8,1 frente a 9,3 de Ler ($P < 0,01$).

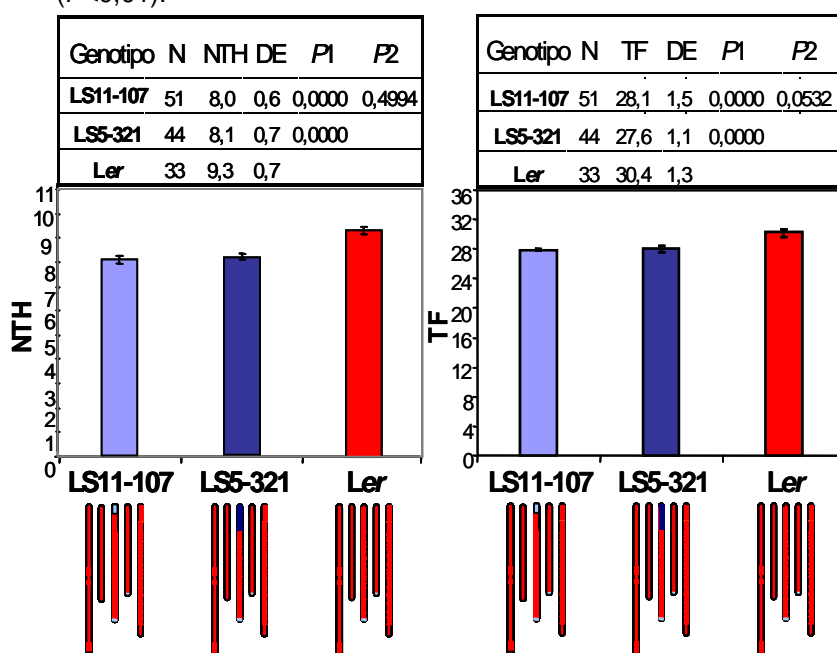


Figura 21. Efecto del alelo *FAQ3*-Shak en el tiempo de floración en condiciones de día largo. En las tablas superiores se indican: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas homocigotas *FAQ3*-Shak frente a Ler; **P2**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las dos líneas homocigotas *FAQ3*-Shak. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y del tiempo de floración. En la parte inferior de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

En cuanto a TF, las plantas de las dos líneas seleccionadas florecieron de media a los 28 días mientras que las plantas Ler lo hicieron a los 30 días. Los valores medios de las líneas LS11-107 y LS5-321 no difirieron significativamente.

Estos resultados muestran que las dos líneas portadoras de la región *FAQ3-Shak* son de floración temprana en comparación al control Ler.

En condiciones de DC (**Figura 22**), la línea LS11-107 floreció con una media de 34 hojas y la línea LS5-321 con 32, mientras el control Ler floreció con casi 39 hojas ($P < 0,01$). En lo que respecta al TF, tanto la línea LS5-321 como la LS11-107 florecieron antes que Ler, si bien sólo para la primera las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Estos análisis permiten concluir que la región *FAQ3-Shak* confiere fenotipo de floración temprano con respecto a Ler tanto en condiciones de fotoperiodo de DL como de DC. El alelo *FAQ3-Shak* reduce el número total de hojas en 1,2 y 5,3 en DL y DC respectivamente. En cuanto al TF, *FAQ3-Shak* acelera el tiempo de floración en 3 días en ambas condiciones de fotoperiodo. Además el fenotipo temprano similar observado en ambas líneas permitió acotar la localización de *FAQ3* a las 2,5 Mb superiores del cromosoma 3.

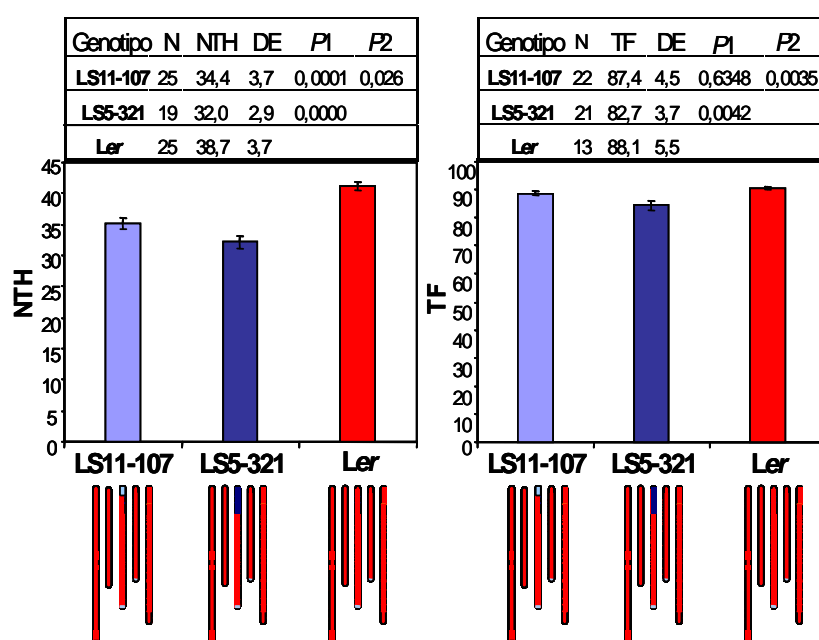


Figura 22. Efecto del alelo *FAQ3-Shak* en el tiempo de floración en condiciones de día corto.

En las tablas superiores se indican: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas homocigotas *FAQ3-Shak* frente a Ler; **P2**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las dos líneas homocigotas *FAQ3-Shak*. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y del tiempo de floración. En la parte inferior de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

2.2.2 Relaciones de dominancia entre los alelos de *FAQ3*

La relación de dominancia de los alelos *FAQ3* se estableció mediante el análisis del tiempo de floración de plantas heterocigóticas para esta región. Las plantas heterocigóticas se obtuvieron de dos formas diferentes: mediante el cruzamiento de la línea LS11-107 con Ler para obtener plantas F_1 , y mediante la autofecundación de la línea LS-22-703, heterocigótica para la región *FAQ3-Shak*.

Las plantas F_1 junto con plantas de las dos líneas homocigotas para la región *FAQ3-Shak* y el parental Ler se cultivaron en condiciones de DL (**Figura 23**). El NTH de las plantas F_1 fue similar al del parental Ler (7,4 hojas frente a 7,5 hojas; $P > 0,01$) y mayor que el NTH de las dos líneas homocigotas *FAQ3-Shak*, indicando que para este carácter el alelo *FAQ3-Shak* se comporta como recesivo frente al alelo *FAQ3-Ler*.

En cuanto al TF, las plantas F_1 florecieron prácticamente al mismo tiempo que el parental LS11-107 y más tempranas que el parental Ler ($P < 0,01$). Por lo tanto a diferencia del NTH, el alelo *FAQ3-Shak* se comporta como dominante para el carácter TF con respecto al alelo *FAQ3-Ler*.

Puesto que la relación de dominancia entre los alelos *FAQ3* fue diferente para el NTH y el TF, analizamos este mismo comportamiento en una población de tipo F_2 de 204 individuos

obtenidos por autofecundación de la línea LS22-703. Estas plantas se cultivaron en condiciones de DL, y tras ser genotipadas con marcadores de la región *FAQ3* se agruparon en los 3 grupos genotípicos (**Figura 24**). Las plantas recombinantes en la región *FAQ3* se descartaron de este agrupamiento y de los análisis que se indican a continuación. La variación fenotípica observada para NTH en esta F_2 fue continua y reducida, alcanzando las 5 hojas de diferencia entre los valores extremos.

Para determinar el grado de dominancia del alelo *FAQ3-Shak* se comparó el valor medio de NTH y TF de los 3 grupos genotípicos de *FAQ3* (**Figura 25**). En el NTH, las plantas heterocigóticas para *FAQ3* fueron significativamente más tempranas que las plantas control *Ler* (8,3 hojas frente 9,3 hojas; $P < 0,01$) y muy similares a las homocigotas para *FAQ3-Shak*.

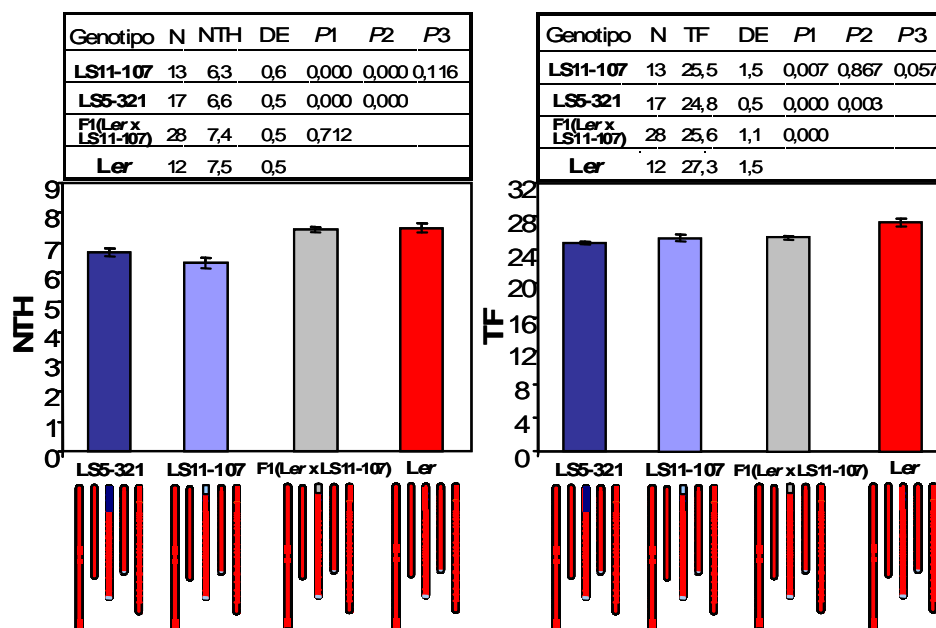


Figura 23. Relación de dominancia entre los alelos de *FAQ3*

En las tablas superiores se indican: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada uno de los genotipos analizados frente a *Ler*; **P2**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de medias de cada una de las líneas homocigotas *FAQ3-Shak* frente a la línea F_1 ; **P3**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las dos líneas homocigotas *FAQ3-Shak*. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y tiempo de floración. En la parte inferior de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas analizadas. El experimento se realizó en condiciones de DL.

Igualmente, las plantas heterocigotas florecieron al mismo tiempo que las homocigotas *FAQ3-Shak* y antes que las plantas *Ler* (32,0 frente a 34,4; $P < 0,01$). Estos resultados muestran que tanto para NTH como para TF, el alelo *FAQ3-Shak* se comporta como dominante en comparación con el alelo *FAQ3-Ler*. El diferente comportamiento de dominancia del alelo *FAQ3-Shak* en plantas F_1 y en familias F_2 para NTH y no para FT sugiere la existencia de un componente materno en el efecto de *FAQ3* en el número de hojas pero no en el tiempo de floración. La confirmación de este efecto requiere un análisis genético más detallado.

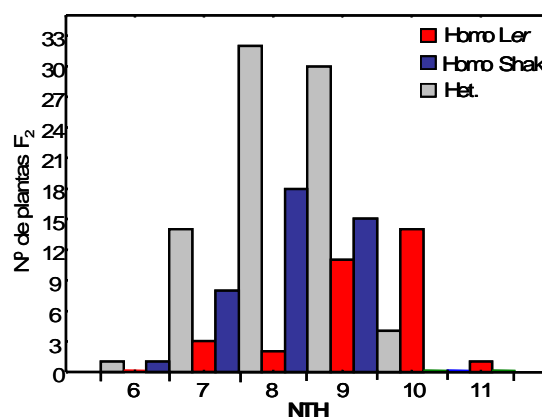


Figura 24. Distribución del NTH en una población segregante para *FAQ3*. Las barras representan el número de plantas segregantes de cada categoría. El experimento se realizó en condiciones de DL.

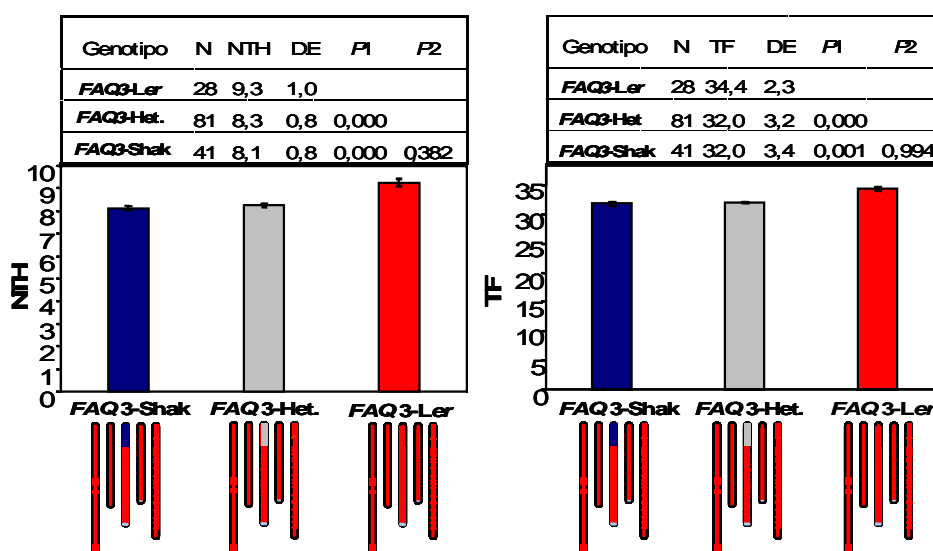


Figura 25. Relación de dominancia entre los alelos de *FAQ3* en una población F_2 .

En las tablas superiores se indican: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada uno de los grupos de plantas frente a *Ler*; **P2**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las plantas homocigotas *FAQ3-Shak* y las plantas heterocigotas *FAQ3*. En los histogramas las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y tiempo de floración de las tres clases genotípicas de la población F_2 mostrada en la Figura 23. En la parte inferior de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

2.3 Mapeo fino de *FAQ3*

2.3.1 Obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión

El mapeo fino de un locus en base a su fenotipo requiere distinguir de forma inequívoca las clases genotípicas a partir del fenotipo. Puesto que *FAQ3* tiene un efecto genético reducido, no puede determinarse su genotipo a partir de los valores fenotípicos individuales de las plantas recombinantes F_2 , ya que el efecto ambiental es similar al efecto genético. El efecto ambiental puede reducirse analizando un número suficiente de replicas de cada línea recombinante dentro de la región de interés. Por otra parte, el genotipado de un locus cuantitativo es más sencillo en líneas homocigóticas que en líneas heterocigóticas debido al menor número de clases genotípicas implicadas.

Por esas razones, para el mapeo fino de *FAQ3* se utilizaron líneas homocigotas portadoras de eventos de recombinación en la región cromosómica correspondiente. Estas líneas las hemos denominado líneas de mini-introgresión porque el tamaño de los segmentos introgresados en cada una de ellas es más pequeño que el de la línea de introgresión de partida (Figura 26). Se generaron dos grupos de líneas de mini-introgresión definidas por la posición de la región introgresada *Shak* con respecto al centrómero, que se denominaron líneas de introgresión distales y líneas de introgresión proximales (Figura 26). La representación gráfica de todas las líneas de mini-introgresión distales y proximales asemeja una escalera, por lo que hemos denominado al conjunto de líneas solapantes de mini-introgresión que cubren toda la región de mapeo *escaleras de líneas de mini-introgresión*. De forma análoga a las RILs, estas escaleras son poblaciones de mapeo permanentes aunque sólo son válidas para el estudio de la región segregante seleccionada. Estas líneas recombinantes homocigotas se pueden cultivar en número ilimitado para reducir el efecto ambiental, lo que permite el genotipado inequívoco de *FAQ3* en cada recombinante. Para obtener las *escaleras de líneas de mini-introgresión* se realizaron los siguientes pasos (Figura 26):

1. A partir de la población F_2 derivada de la autofecundación de la línea LS22-703 (Figura 6B y Figura 26) se seleccionaron plantas heterocigóticas para eventos de recombinación en la región *FAQ3* mediante el análisis de marcadores moleculares localizados en esta región (Tabla 7, **Materiales y Métodos**).

2. Se cultivaron las familias F_3 obtenidas por autofecundación de cada una de las plantas F_2 recombinantes (20-30 plantas por cada familia F_3).
3. Se genotiparon 16 plantas de cada familia F_3 independiente.
4. Para cada familia F_3 se seleccionaron entre 1 y 4 plantas hermanas, homocigóticas para el evento de recombinación de interés y se obtuvieron sus descendencias F_4 por autofecundación. Estas plantas se denominaron con el mismo código de la planta F_2 original porque son portadoras del mismo evento de recombinación aunque en homocigosis.

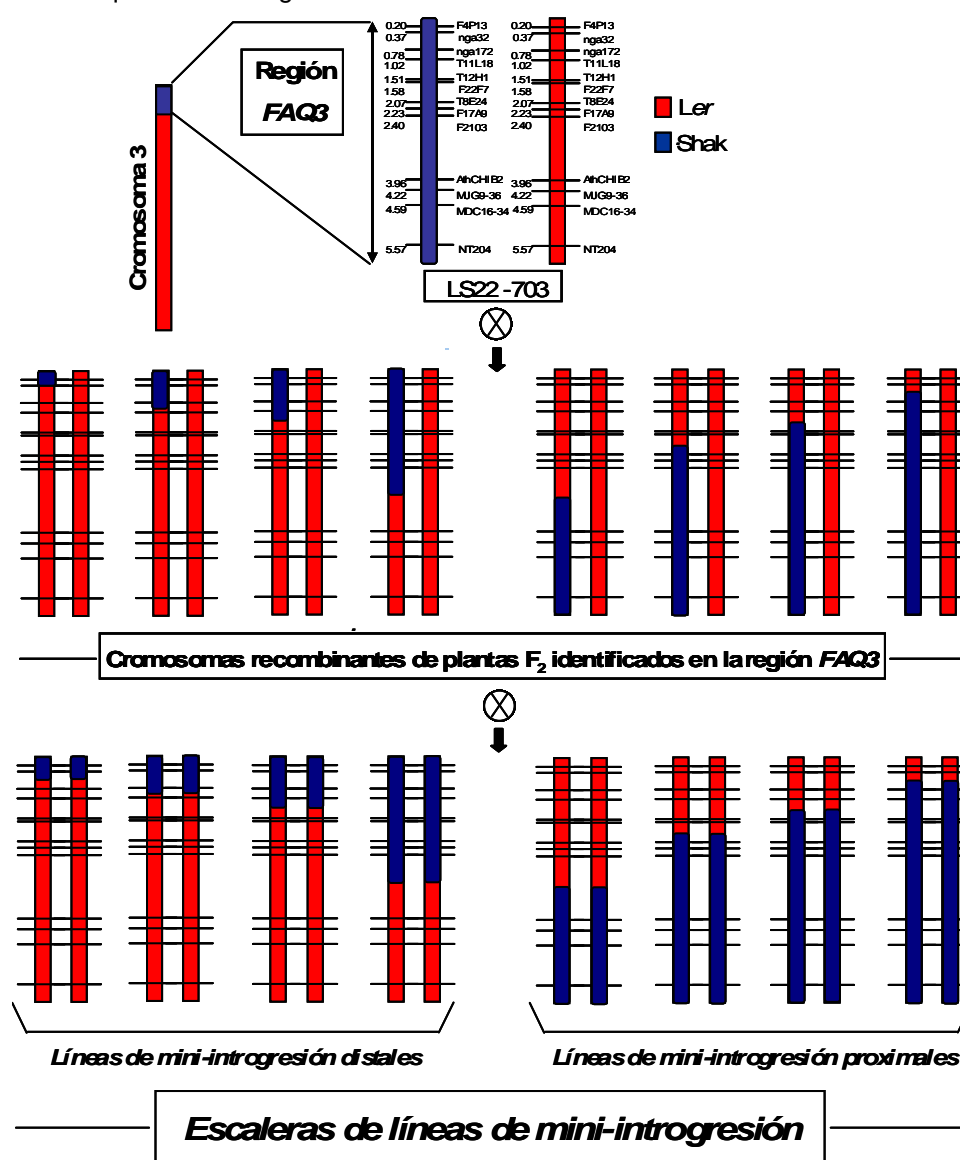


Figura 26. Diseño experimental para la obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión.

Las barras representan la región FAQ3 en cada uno de los dos cromosomas de cada planta. Las líneas horizontales negras representan la posición de los marcadores moleculares analizados dentro de la región FAQ3. En color rojo se muestran las regiones cromosómicas de origen Ler y en color azul las de origen Shak. El símbolo \otimes representa el proceso de autofecundación.

De esta forma, a partir del genotipado con 13 marcadores (Tabla 7, Materiales y Métodos) de 207 plantas F_2 se obtuvieron un total de 19 líneas de mini-introgresión. Catorce de ellas son distales, presentan segmentos introgresados de cinco tamaños diferentes y parcialmente solapantes, delimitados entre el telómero superior del cromosoma 3 y la posición 2,40 Mb definida por el marcador F2103 (Figura 27). Las otras 5 líneas de introgresión proximales delimitaron 4 regiones introgresadas de tamaños diferentes y parcialmente

solapantes, comprendidas entre los marcadores nga32 y NT204 en posiciones físicas 0,37 y 5,57 Mb respectivamente (**Figura 27**). Las líneas de mini-introgresión se obtuvieron a lo largo de las 6 Mb de longitud de la introgresión original de la línea LS22-703, lo que permitió al mismo tiempo mapear de forma precisa *FAQ3* en la región acotada de 2,5 Mb y descartar la presencia de otros loci que afecten al tiempo de floración en el resto de la introgresión original. Siempre que fue posible se obtuvieron varias líneas independientes para cada región cromosómica introgresada, ya que si el genotipo de *FAQ3* es diferente en líneas portadoras de la misma región, se podría acotar el QTL entre los dos marcadores que delimitan la región dónde se seleccionaron los eventos de recombinación de dichas líneas.

2.3.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión.

Para determinar el genotipo de *FAQ3* se cultivaron conjuntamente en condiciones de DL plantas del parental Ler y de cada una de las líneas de mini-introgresión F₄. Se analizó tanto el NTH como el TF pero sólo se presentan los resultados de NTH debido a que la variación genética fue mayor para este carácter (**Figura 27**).

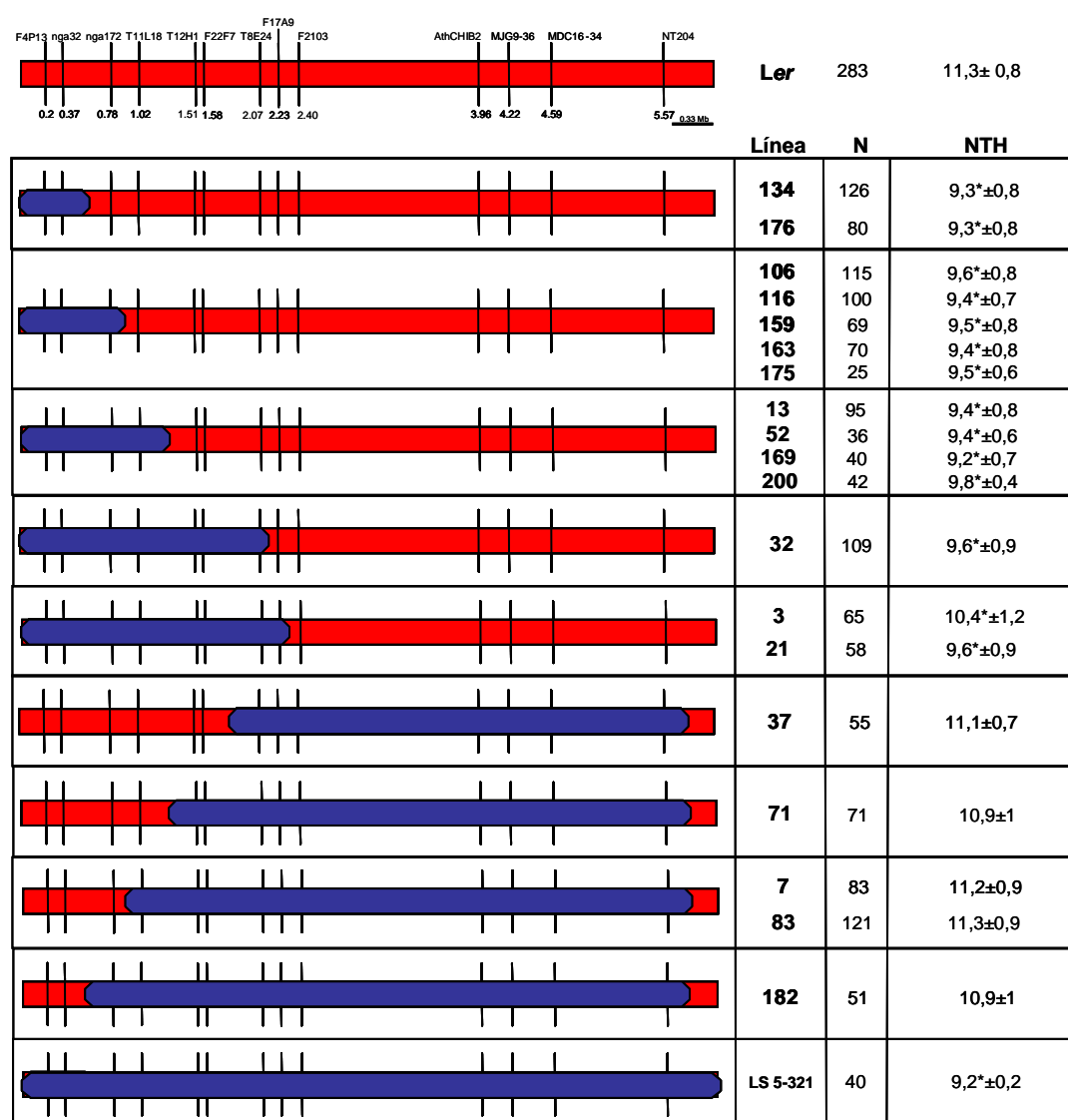


Figura 27. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región FAQ3.

En la parte izquierda de la figura se muestra el genotipo gráfico de las líneas de introgresión; las barras de color rojo representan la región *FAQ3* de origen Ler y las barras azules representan las introgresiones de origen Shak. Las líneas verticales representan la posición de los marcadores moleculares. En la parte derecha de la figura se muestran los valores de NTH de cada una de las líneas. **Línea**: número de la línea F₃/F₄; **N**: número de individuos analizados de cada línea, **NTH**: media ± DE del NTH de cada línea, *: diferencias estadísticamente significativas ($P<0,01$).

Como se muestra en la **Figura 27**, las 14 líneas distales presentaron un comportamiento de floración temprana similar al descrito previamente para las líneas LS5-321 y LS11-107 ($P < 0,01$), por lo que estas líneas son portadoras de los mismos alelos *FAQ3*-Shak. Estos resultados fueron consistentes con el hecho de que ninguna de las 5 líneas proximales difirió significativamente en su NTH con respecto a *Ler*. Por lo tanto concluimos que *FAQ3* está localizado en una región distal de 0,78 Mb comprendida entre el telómero del brazo superior del cromosoma 3 y el marcador *nga172* (**Figura 28**).

Con el propósito de identificar los genes implicados en el control del tiempo de floración dentro de la región original de 6 Mb del cromosoma 3, se analizó la secuencia genómica de *Arabidopsis* en esa región (<http://www.arabidopsis.org>; Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Así se identificaron un total 12 genes para los que se había descrito previamente efecto en el inicio de la floración y que podrían ser responsables del efecto de *FAQ3*. La región donde se localiza *FAQ3* solapa únicamente con dos de estos genes: *AtMBD9* (Peng y col., 2006) y *COL2* (Ledger y col., 2001) en posiciones 0,18 y 0,48 Mb respectivamente (**Figura 28**), por lo que éstos son los principales genes candidatos identificados para *FAQ3*.

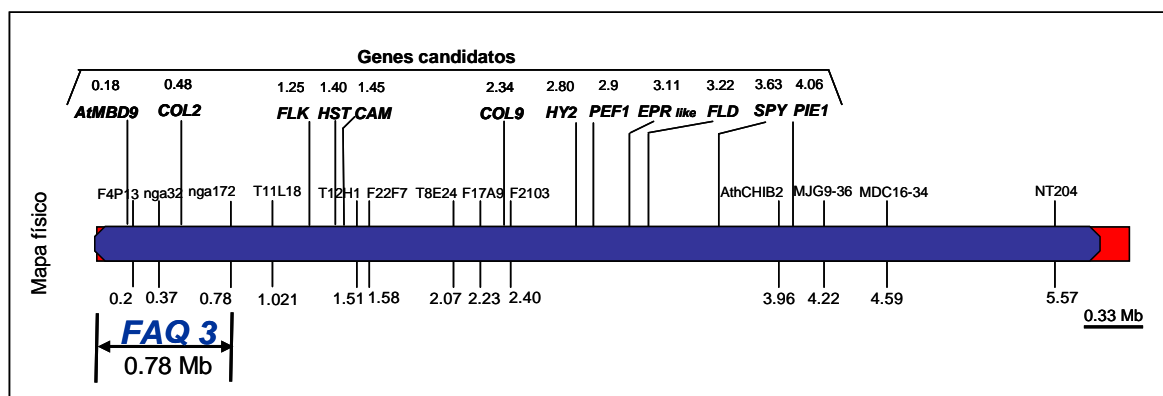


Figura 28. Mapeo fino de *FAQ3*.

En la parte superior de la figura se especifican los loci para los que se ha descrito algún efecto en el tiempo de floración en esa región genómica y sus posiciones. En la parte inferior se muestra el mapa físico de la región en la que se localiza *FAQ3*

3. Caracterización genética del locus *FAQ2*, mapeo fino y búsqueda de genes candidatos

3.1 Obtención de líneas de introgresión de *FAQ2*

La región superior del cromosoma 1, denominada *FAQ2*, se identificó como portadora de alelos de floración temprana en líneas de introgresión de C24, Ri-0 y Shak en fondo genético Ler. Con el fin de estudiar el efecto de *FAQ2* en el tiempo de floración y realizar su mapeo fino, se obtuvieron líneas que tuviesen una única introgresión de dicha región *FAQ2* a partir de las líneas denominadas LC7, LR12 y LS5 portadoras de dos a cinco introgresiones de entre 1,5 y 12 Mb, derivadas de las poblaciones de C24, Ri-0 y Shak respectivamente (ver **Materiales y Métodos, Figura 7A**).

La línea LC7 se autofecundó y tras genotiparse 20 plantas descendientes con varios marcadores (**Tabla 6, Materiales y Métodos**) se seleccionó el individuo LC7-1, homocigoto para la región *FAQ2*-C24. Las líneas LR12 y LS5 se cruzaron con la accesión Ler y se obtuvieron las correspondientes poblaciones F_2 . De cada una de las dos poblaciones segregantes F_2 se cultivaron entre 220-240 individuos, y se seleccionaron las plantas portadoras de una única introgresión en el cromosoma 1 (**Figura 7B**) mediante el análisis de uno a tres marcadores moleculares por cada una de las regiones genómicas de Ri-0 o Shak existentes en las líneas de partida (**Tabla 6**). En la población segregante derivada de la línea LR12 se seleccionaron plantas portadoras de la introgresión Ri-0 correspondiente a *FAQ2* tanto en homocigosis (LR12-231) como en heterocigosis (LR12-312). En la población derivada de la línea LS5 sólo se identificó una planta heterocigótica para la región *FAQ2*-Shak denominada LS5-239. Posteriormente, se analizaron 83 individuos de la descendencia de esta planta obtenida por autofecundación y se seleccionó el individuo LS5-239-21 como homocigoto para la región *FAQ2*-Shak.

3.2 Caracterización de *FAQ2*

3.2.1 Efecto de los alelos *FAQ2*

Para determinar el efecto de los diferentes alelos *FAQ2* en el tiempo de floración se analizó el NTH y el TF de plantas portadoras de la región *FAQ2*-C24, *FAQ2*-Ri-0 y *FAQ2*-Shak en homocigosis (**Figuras 29 y 30**).

Inicialmente sólo disponíamos de las líneas LC7-1 y LR12-231 homocigotas para los alelos *FAQ2*-C24 y *FAQ2*-Ri-0 por lo que se analizaron plantas de ambos genotipos en dos experimentos en condiciones de DL. En ambos experimentos las plantas *FAQ2*-C24 y las *FAQ2*-Ri-0 florecieron de media con 1,5 hojas menos que las plantas Ler ($P<0,01$) (**Figura 29**).

Con el objetivo de cuantificar el efecto del alelo *FAQ2*-Shak se realizó un tercer experimento en condiciones de DL, en el que se cultivaron plantas de la línea LS5-239-21 junto con plantas homocigóticas para *FAQ2*-C24 y *FAQ2*-Ri-0. En este experimento, el NTH de las tres líneas de introgresión *FAQ2* fueron similares y fue menor que el de Ler, con una diferencia media de 1,2-1,3 ($P<0,01$). Estos resultados permiten concluir que para el NTH los alelos *FAQ2*-C24, *FAQ2*-Ri-0 y *FAQ2*-Shak muestran un comportamiento temprano similar y de efecto reducido en comparación con el alelo *FAQ2*-Ler.

En cuanto a TF, estos experimentos mostraron que las plantas *FAQ2*-C24 florecen entre 2,9-6,2 días más tempranas que el parental Ler y entre 2-4,9 días más tempranas que la línea *FAQ2*-Ri-0 ($P<0,01$, **Figura 30**). Las plantas homocigotas *FAQ2*-Ri-0 florecieron con valores de TF cercanos a los de Ler ($P<0,01$), con diferencias de 0,9-1,4 frente a Ler. Las plantas homocigotas para el alelo *FAQ2*-Shak fueron de media 1,4 días más tempranas que el parental Ler y muy similares a las homocigotas *FAQ2*-Ri-0. Por lo tanto las líneas portadoras de la regiones *FAQ2*-C24, *FAQ2*-Ri-0 y *FAQ2*-Shak en homocigosis son de floración temprana en comparación con Ler, siendo la línea *FAQ2*-C24 más temprana que las líneas *FAQ2*-Ri-0 y *FAQ2*-Shak ($P<0,01$).

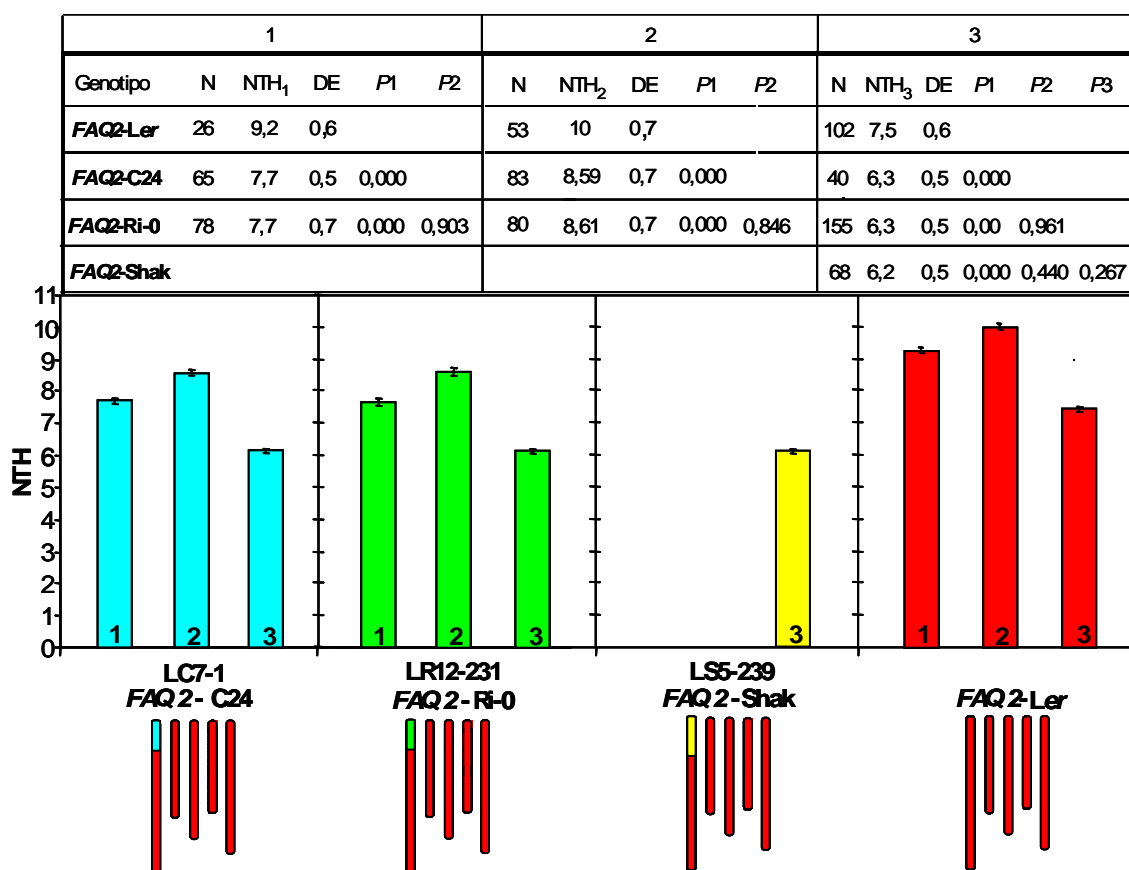


Figura 29. Efecto de los alelos FAQ2 en el NTH

En la tabla superior se indican los valores de NTH en tres experimentos independientes realizados en DL. **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **DE**: desviación estándar; **P₁**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas FAQ2 frente a Ler; **P₂**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias de las líneas FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak frente a FAQ2-C24; **P₃**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las líneas FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak. Los índices 1, 2 y 3 en la tabla superior y dentro de las barras indican cada uno de los experimentos realizados. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

El análisis de la floración de estas líneas permite concluir que la región FAQ2 procedente de las accesiones C24, Ri-0 y Shak confiere un fenotipo de floración temprano frente a Ler en condiciones de fotoperiodo de DL. Si bien los tres alelos C24, Ri-0 y Shak presentan un efecto similar en NTH, cuyos efectos difieren ligera pero significativamente en el TF, presentando un efecto FAQ2-C24>FAQ2-Shak>FAQ2-Ri-0 en comparación a FAQ2-Ler. Estos resultados sugieren que las regiones FAQ2 de las distintas accesiones podrían tener una composición alélica diferente.

3.2.2 Relaciones de dominancia entre los alelos de FAQ2

La relación de dominancia de los diferentes alelos de FAQ2 se estableció mediante el análisis fenotípico y genotípico de poblaciones tipo F₂. Estas poblaciones se obtuvieron mediante autofecundación de las plantas LR12-312 y LS5-239 seleccionadas como heterocigotas para la región FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak o autofecundación de plantas F₁ derivadas del cruzamiento de la línea LC7-1 homocigota para FAQ2-C24 con Ler. Las tres poblaciones F₂ se cultivaron en condiciones de DL dónde se analizaron para NTH pero para TF sólo se analizaron en dos poblaciones, puesto que en la (población) derivada de la línea LC7-1 no pudo analizarse (Figuras 31 y 32). En total se analizaron 155, 334 y 83 plantas de las poblaciones de FAQ2-C24, FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak respectivamente. Éstas se genotiparon para los marcadores

moleculares de la región *FAQ2* (Tabla 6, Materiales y Métodos) y se clasificaron en los 3 grupos genotípicos (Figura 31A). Las plantas recombinantes en la región *FAQ2* de cada población no se utilizaron en los análisis que se indican a continuación.

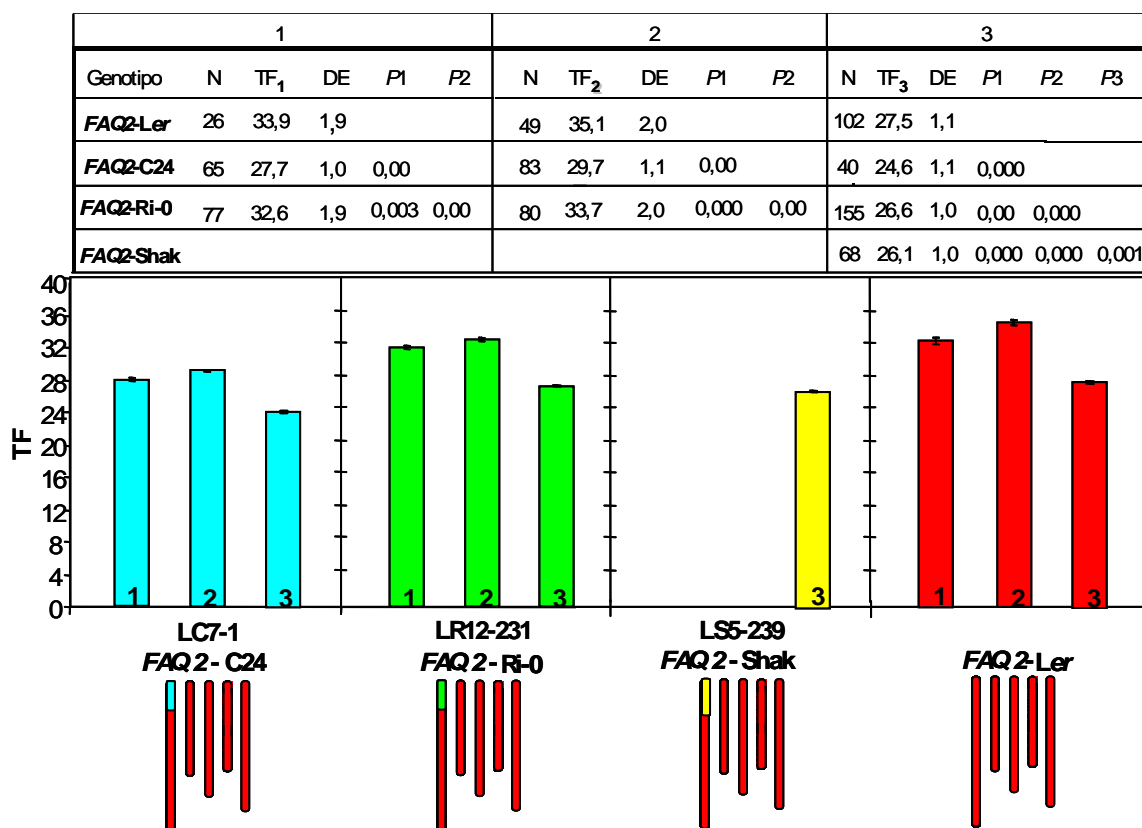


Figura 30. Efecto de los alelos *FAQ2* en el TF

En la tabla superior se indican los valores de TF en tres experimentos independientes realizados en DL: **N**: número de plantas analizadas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P₁**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas *FAQ2* frente a *Ler*; **P₂**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias de las líneas *FAQ2-Ri-0* y *FAQ2-Shak* frente a *FAQ2-C24*; **P₃**: valor de probabilidad obtenido en el contraste de medias entre las líneas *FAQ2-Ri-0* y *FAQ2-Shak*. Los índices 1, 2 y 3 en la tabla superior y dentro de las barras indican cada uno de los experimentos realizados. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del tiempo de floración. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

Para determinar el grado de dominancia de los alelos *FAQ2-C24*, *FAQ2-Ri-0* y *FAQ2-Shak* se compararon los valores medios de NTH y TF de los tres grupos genotípicos para *FAQ2* en cada población segregante. Como se muestra en la **Figura 31B**, en las poblaciones segregantes para las regiones *FAQ2-C24* y *FAQ2-Ri-0* el número de hojas de las plantas heterocigóticas fue intermedio entre los valores de las plantas *Ler* y las plantas homocigóticas correspondientes ($P < 0,01$). Por lo tanto, los alelos *FAQ2-C24* y *FAQ2-Ri-0* se comportan como semidominantes con respecto al alelo *FAQ2-Ler*. Por el contrario, en la población segregante para *FAQ2-Shak* las plantas heterocigóticas florecieron prácticamente al mismo tiempo que *Ler* ($P > 0,01$) y significativamente más tarde que las plantas homocigóticas *FAQ2-Shak* ($P < 0,01$). Por tanto, para NTH el alelo *FAQ2-Shak* se comporta como recesivo frente al alelo *FAQ2-Ler*. En cuanto al TF (**Figura 32**), en la población segregante para *FAQ2-Ri-0* las plantas heterocigóticas presentaron un TF intermedio aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,01$). Por el contrario las plantas heterocigóticas para *FAQ2-Shak* florecieron al mismo tiempo que *Ler* y más tardíamente que las homocigotas *FAQ2-Shak*, si bien las diferencias tampoco fueron significativas ($P > 0,01$). Estos resultados sugieren que para el TF el alelo *FAQ2-Ri-0* es semidominante y el alelo *FAQ2-Shak* es recesivo de manera similar a lo observado para el NTH.

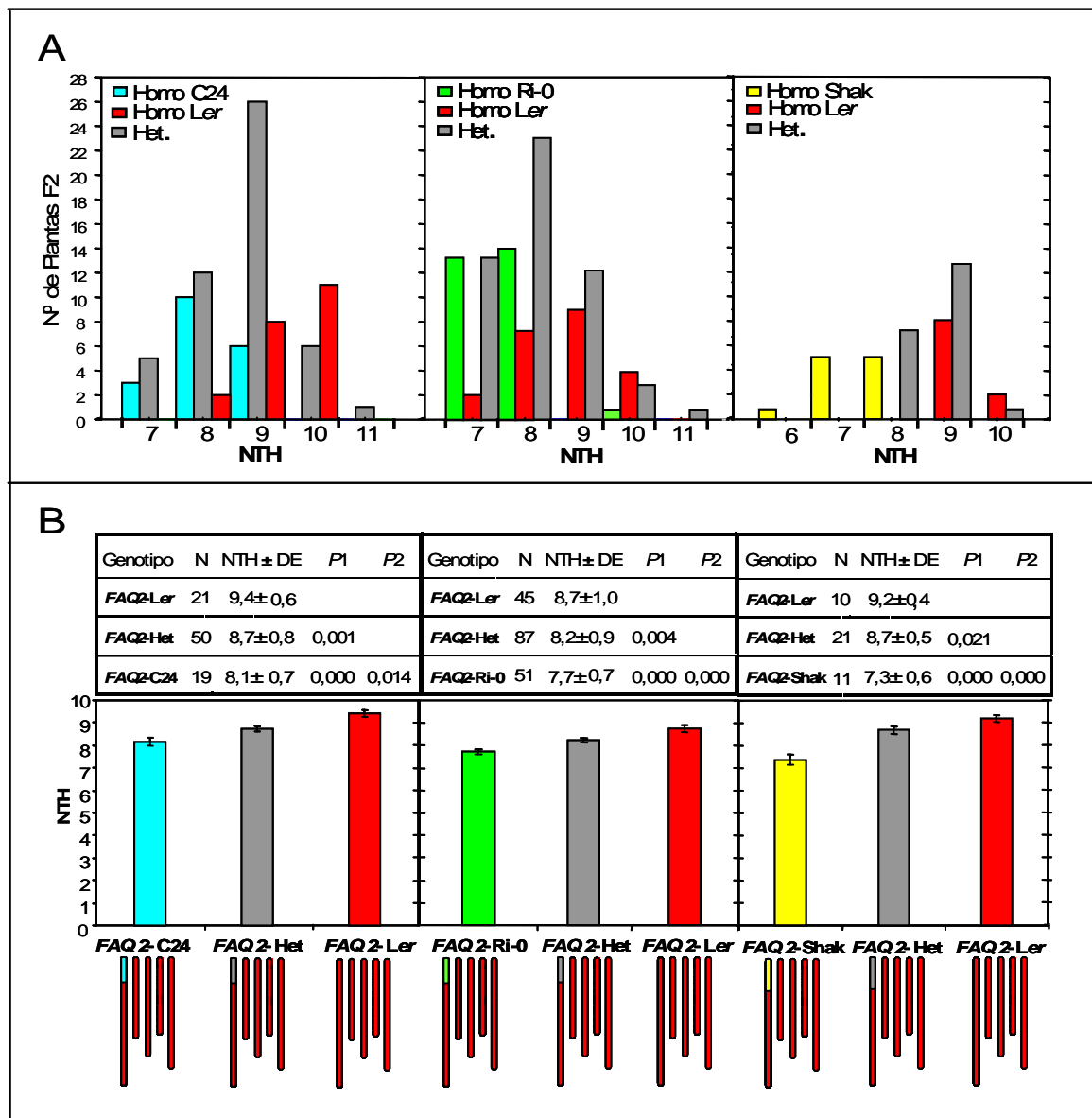


Figura 31. Relación de dominancia de los distintos alelos de *FAQ2* para el NTH. A. Distribución del NTH en las 3 poblaciones segregantes F₂ en condiciones de DL. Las barras representan el número de plantas de cada categoría. B. Resumen de los datos obtenidos en el análisis del NTH. En las tablas se indica, **NTH**: número total de hojas; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de medias de cada uno de los grupos de plantas frente a Ler; **P2**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de medias entre las plantas homocigotas para los distintos alelos *FAQ2* y las plantas heterocigóticas. En los histogramas, las barras representan la media ± EE del número total de hojas. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las plantas analizadas. Los colores rojo, azul, verde y amarillo representan las plantas homocigóticas *FAQ2* para los alelos Ler, C24, Ri-0 y Shak respectivamente, mientras el gris representa las plantas heterocigóticas.

3.3 Mapeo fino de los distintos alelos *FAQ2*

3.3.1 Obtención de escaleras de líneas de mini-introgresión

Como se ha descrito en los apartados 2.1 y 2.2 de este capítulo el efecto genético de los distintos alelos *FAQ2* en el fenotipo de floración fue reducido. Por ello, al igual que en el caso de *FAQ3* para localizar de forma precisa los distintos alelos *FAQ2*, se obtuvieron escaleras de líneas de mini-introgresión para los alelos C24, Ri-0 y Shak en fondo genético Ler (ver apartados 3.1 y 3.2 del capítulo anterior). Estas escaleras están conformadas por líneas de

mini-introgresión distales y proximales que presentan eventos de recombinación en homocigosis. Siempre que fue posible se obtuvieron varias líneas independientes para las mismas regiones cromosómicas introgresadas, lo que permite acotar los alelos *FAQ2* entre los dos marcadores que delimitan el intervalo dónde se seleccionaron los eventos de recombinación.

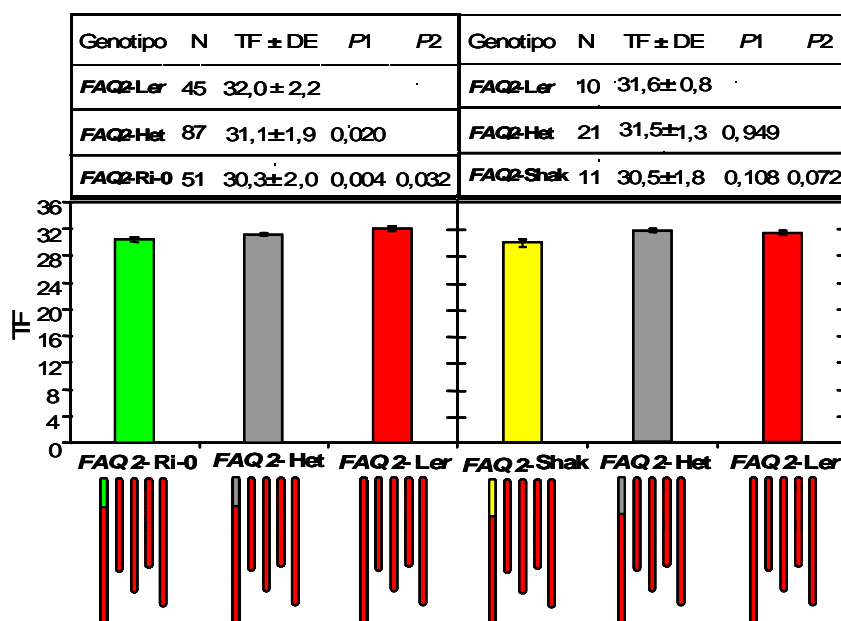


Figura 32. Relación de dominancia de los alelos *FAQ2* para el TF.

En las tablas superiores se indica, **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada uno de los grupos de plantas frente a *Ler*; **P2**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de medias entre las plantas homocigotas para los alelos *FAQ2* y las plantas heterocigóticas. En los histogramas, las barras representan la media ± EE del tiempo de floración. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las plantas analizadas. Los colores rojo, verde y amarillo representan las plantas homocigóticas *FAQ2* para los alelos *Ler*, *Ri-0* y *Shak* respectivamente, mientras el gris representa las plantas heterocigóticas.

Para obtener las escaleras de C24 en fondo *Ler*, se analizaron 369 plantas de una población segregante F_2 (*Ler* x LC7-1) con 22 marcadores de la región *FAQ2*-C24 (**Tabla 8, Materiales y Métodos**). A partir de las plantas recombinantes seleccionadas se generaron 23 líneas de mini-introgresión diferentes. Se obtuvieron 14 líneas de mini-introgresión distales que presentan segmentos introgresados de origen C24 de ocho tamaños diferentes y parcialmente solapantes, delimitados entre el inicio del cromosoma 1 y la posición 5,50 Mb, definida por el marcador T24D18 (**Figura 33A**). Las otras nueve líneas presentan mini-introgresiones proximales que delimitan siete regiones introgresadas de tamaños diferentes y parcialmente solapantes comprendidas entre los marcadores T1G11 y T24D18 en posiciones físicas 1,24 y 5,50 Mb respectivamente (**Figura 33B**).

De forma similar se obtuvieron un total de 31 líneas de mini-introgresión de *Ri-0* en fondo *Ler* mediante el análisis de 334 plantas de una población F_2 (*Ler* x LR12) con diez marcadores de la región *FAQ2*-*Ri-0* (**Tabla 8, Materiales y Métodos**). De éstas, 17 son distales y presentan segmentos introgresados de origen *Ri-0* de nueve tamaños diferentes y parcialmente solapantes, delimitados entre el inicio del cromosoma 1 y el marcador T24D18 localizado en la posición 5,50 Mb (**Figura 34A**). Las 14 líneas proximales restantes delimitan nueve regiones genómicas *Ri-0* de diferentes tamaños y que están comprendidas entre los marcadores nga59 y T24D18 en posiciones físicas 0,02 y 5,50 Mb respectivamente (**Figura 34B**).

Finalmente, se obtuvieron un total de 14 líneas de mini-introgresión de *Shak* a partir del análisis de 83 plantas de una población F_2 (*Ler* x LS5) con diez marcadores (**Tabla 8,**

Materiales y Métodos). El tamaño de la población de tipo F_2 de *FAQ2-Shak* fue el más reducido de las tres poblaciones analizadas para la región *FAQ2*, por lo que el número de líneas de mini-introgresión obtenidas y la resolución del mapeo fino fue menor. Se generaron nueve líneas de introgresión distales que presentan segmentos introgresados de origen *Shak* de seis tamaños diferentes y parcialmente solapantes, delimitados entre el inicio del cromosoma 1 y la posición 4,43 Mb, definida por el marcador F3F19 (**Figura 35A**). Las otras cinco líneas de mini-introgresión proximales delimitaron cinco regiones introgresadas de distintos tamaños comprendidas entre los marcadores *nga59* y T24D18 en posiciones 0,02 y 5,50 respectivamente (**Figura 35B**).

3.3.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión

Con el fin de genotipar *FAQ2* en cada línea de introgresión las poblaciones de escaleras de líneas de mini-introgresión de *FAQ2-C24*, *FAQ2-Ri-0* y *FAQ2-Shak* se cultivaron en condiciones de DL en experimentos independientes y se cuantificó su NTH y TF. Sólo se presentan los resultados para NTH debido a que la variación genética es mayor para este carácter.

Para cada línea se calculó el valor medio de NTH y la desviación estándar. Cuando una línea de mini-introgresión floreció significativamente antes que el control *Ler* ($P < 0,01$), se consideró que *FAQ2* se localiza en la región genómica introgresada.

3.3.2.1 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de *FAQ2-C24*

El análisis fenotípico de las escaleras de mini-introgresión de *FAQ2-C24* muestra que las 14 líneas distales se agrupan en tres clases fenotípicas según su NTH: tardías, intermedias y tempranas. De las líneas distales sólo la línea de mini-introgresión 21 floreció al mismo tiempo que *Ler*, mientras que el resto fueron significativamente más tempranas ($P < 0,01$) (**Figura 33A**). Dentro de estas líneas tempranas, ocho de ellas (211,8-3, 54,147, 75, 55, 213 y 287) no fueron tan tempranas como las dos líneas que portaban la región completa *FAQ2-C24* en homocigosis (10 y 22), mientras que el otro grupo de cinco líneas (27, 128, 25, 35 y 38) florecieron al mismo tiempo que las dos líneas tempranas originales. Las cinco líneas más tempranas deben ser portadoras de todos los alelos tempranos presentes en las líneas originales y corresponden a las introgresiones distales de mayor tamaño, de entre 3,62 y 5,5 Mb de longitud. Sin embargo, las ocho líneas de floración intermedia fueron portadoras de introgresiones de menor tamaño, comprendidas entre 1,24 y 2,83 Mb. Estos resultados sugieren que existen al menos dos loci *FAQ2-C24* ligados, implicados en las diferencias de floración de manera que las líneas tempranas corresponden a dos genotipos distintos. Las líneas de floración intermedia serían portadoras de alelos tempranos C24 en un locus que estaría situado entre las posiciones físicas 1,15 y 1,57 Mb. Por otra parte las líneas más tempranas portarían además alelos C24 tempranos en un segundo locus proximal situado entre las posiciones 2,43 y 3,92 Mb. Estos resultados son consistentes con el hecho de que ninguna de las 9 líneas proximales fueron tan tempranas como las dos líneas de referencia (10 y 22). Las tres líneas proximales con las introgresiones menores (28, 18 y 36) florecieron con el mismo NTH que *Ler* ($P < 0,01$), mientras que las seis líneas proximales restantes con segmentos introgresados de mayor tamaño (81, 303, 57, 131, 34 y 8-1) presentaron un fenotipo intermedio de floración entre los valores del parental *Ler* y las líneas tempranas de referencia (10 y 22) (**Figura 33B**).

El análisis conjunto de las líneas de mini-introgresión distales y proximales permite concluir que el efecto de *FAQ2-C24* se debe a dos loci ligados que muestran efectos aditivos en los que C24 es portador de alelos tempranos. El locus más distal se ha denominado *FAQ2-C24-A* y se localiza en una región de 0,42 Mb delimitada entre las posiciones 1,15 y 1,57 Mb, mientras que el locus proximal se ha denominado *FAQ2-C24-B* y se localiza en una región de 1,49 Mb de longitud, comprendida entre las posiciones 2,43 y 3,92 Mb (**Figura 36**).

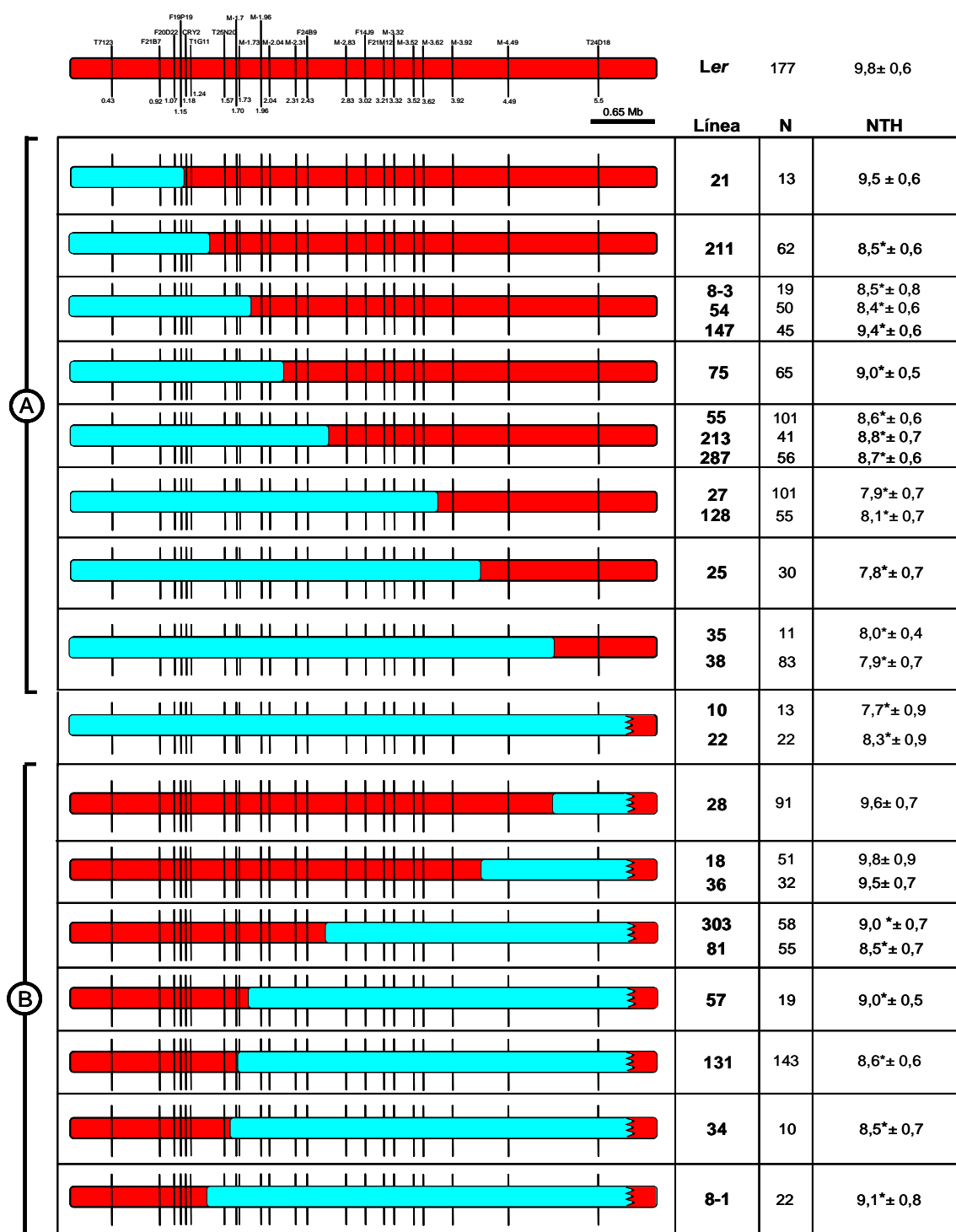


Figura 33. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región FAQ2-C24.

A. Líneas distales; B. Líneas proximales. En la parte izquierda de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas de introgresión; las barras rojas representan la región FAQ2 de origen Ler y las barras azules representan las introgresiones de origen C24. Las líneas verticales representan la posición de los marcadores moleculares analizados. En la parte derecha de la figura se muestran los valores de NTH de cada una de las líneas. **Línea:** número de la línea; **N:** número de individuos analizados; **NTH:** media ± DE del NTH, *: diferencias estadísticamente significativas con respecto a Ler ($P < 0,01$).

3.3.2.2 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de FAQ2-Ri-0

El análisis fenotípico de las 17 líneas de mini-introgresión distales de FAQ2-Ri-0 permitió agruparlas según su NTH en líneas de floración tempranas y en líneas de floración intermedias (Figura 34A).

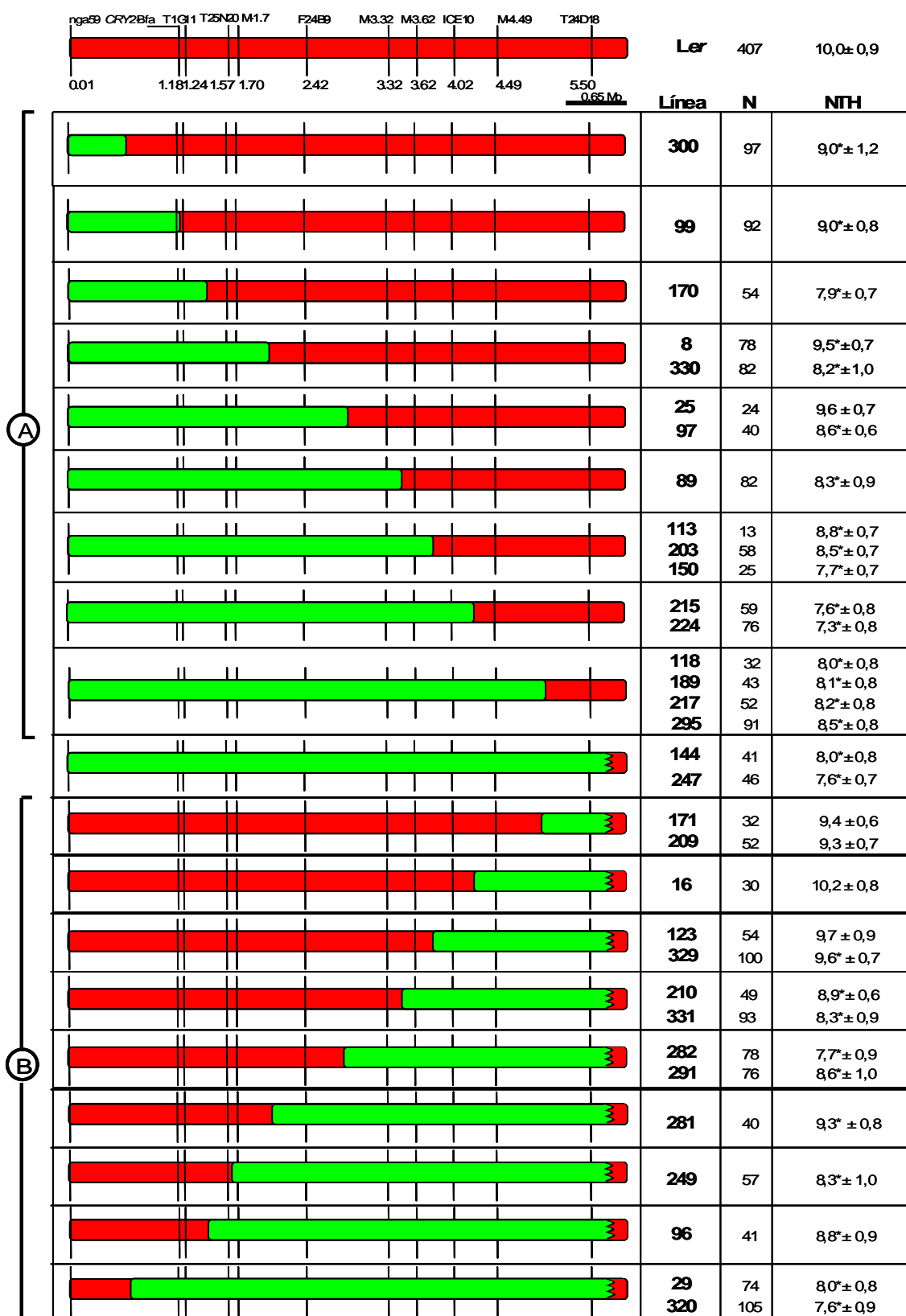


Figura 34. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región FAQ2-Ri-0.

A. Líneas distales; B. Líneas proximales. En la parte izquierda de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas de introgresión; las barras rojas representan la región FAQ2 de origen Ler y las barras verdes representan las introgresiones de origen Ri-0. Las líneas verticales representan la posición de los marcadores moleculares analizados. En la parte derecha de la figura se muestran los valores de NTH de cada una de las líneas. **Línea:** número de la línea; **N:** número de individuos analizados; **NTH:** media ± DE del NTH, *: diferencias estadísticamente significativas con respecto a Ler ($P < 0,01$).

Las siete líneas más tempranas (150, 215, 224, 118, 189, 217 y 295) florecieron al mismo tiempo que las líneas que portaban la región completa *FAQ2-Ri-0* en homocigosis (144 y 247), mientras que las diez líneas intermedias (300, 99, 170, 8, 330, 25, 97, 89, 113 y 203) presentaron valores para NTH que estuvieron entre los valores del parental *Ler* y los valores de las dos líneas tempranas de referencia (144 y 247). Las líneas tempranas son portadoras de las introgresiones de mayor tamaño, comprendidas entre 4,02 y 5,5 Mb, mientras que las de floración intermedia son portadoras de segmentos distales menores delimitados entre 1,24 y 4,02 Mb. Estos resultados sugieren que de forma similar a lo descrito en el análisis del mapeo fino de *FAQ2-C24*, la floración temprana de *FAQ2-Ri-0* viene determinada por dos loci ligados para los que *Ri-0* es portador de los alelos tempranos. Estos resultados fueron coherentes con el análisis de las 14 líneas de mini-introgresión proximales, que en base a sus fenotipos de NTH se agruparon en tres clases: tardías, tempranas e intermedias. La clase tardía, corresponde a las cinco líneas con introgresiones menores (171, 209, 16, 123 y 329) que florecieron con el mismo número de hojas que el parental *Ler* ($P>0,01$). Las dos líneas tempranas (29 y 320) presentaron valores de NTH similares a los de las dos líneas tempranas originales (144 y 247) y fueron portadoras de las introgresiones de mayor longitud. Las siete líneas con floración intermedia (210, 331, 282, 291, 281, 249 y 96) entre los valores del parental *Ler* y los de las dos líneas tempranas originales fueron portadoras de segmentos de introgresión también intermedios (**Figura 34B**). Dos líneas de mini-introgresión distales (170 y 25) y otra proximal (282) presentaron fenotipos extremos diferentes de los de las líneas de introgresión con genotipos similares. Estos fenotipos podrían sugerir una mayor complejidad genética, pero dado el elevado número de líneas utilizadas, será necesaria una nueva evaluación fenotípica y molecular de las mismas para descartar posibles errores de fenotipado o genotipado, o la presencia de múltiples introgresiones no detectadas con los marcadores utilizados. A pesar de estas líneas, la correspondencia entre los tamaños de los segmentos introgresados y los fenotipos observados se puede concluir que existen dos loci ligados con efectos aditivos que afectan a la floración en la región *FAQ2-Ri-0*. El locus más distal se ha denominado *FAQ2-Ri-0-A* y se localiza en una región de 1,18 Mb de longitud comprendida entre las posiciones 0,01 y 1,18 Mb. El locus más proximal que se ha denominado *FAQ2-Ri-0-B* se localiza en una región de 0,40 Mb de longitud entre las posiciones 3,62 y 4,02 Mb (**Figura 36**).

3.3.2.3 Análisis genético de las líneas de mini-introgresión de *FAQ2-Shak*

El análisis fenotípico del NTH de las 9 líneas de mini-introgresión distales permitió agruparlas en dos clases fenotípicas: tardías y tempranas (**Figura 35A**). Las líneas tardías (27, 56, 42 y 23) florecieron al mismo tiempo que *Ler* ($P>0,01$) y contienen las regiones introgresadas distales de menor tamaño. Las 5 líneas tempranas (35, 72, 34, 69 y 66) florecieron con valores de NTH parecidos a los de las líneas portadoras de la región completa *FAQ2-Shak* original (líneas 21 y 44) y fueron portadoras de los segmentos introgresados *Shak* de mayor tamaño. Estos resultados sugieren que el locus *FAQ2-Shak* responsable de las diferencias de floración entre estas líneas se localiza entre las posiciones 1,96 y 3,62 Mb. Sin embargo, puesto que las líneas 23, 35 y 72, portadoras de recombinación en la misma región, mostraron fenotipos de floración diferentes este locus podría acotarse en el intervalo definido por las posiciones 1,96 y 2,83 Mb. Por otra parte las 5 líneas de mini-introgresión proximales analizadas fueron tempranas, con valores de NTH parecidos a los de las líneas originales (líneas 21 y 44), de manera que el locus *FAQ2-Shak* responsable se acotó a la longitud de la introgresión de tamaño más reducido (delimitada por los marcadores M-3,62 y T24D18 en posiciones 3,62 y 5,50 Mb respectivamente, (**Figura 35B**). El análisis conjunto de ambos grupos de líneas de mini-introgresión en la región *FAQ2-Shak* sugiere la existencia de 2 loci estrechamente ligados, implicados en la floración de *FAQ2-Shak* en los que *Shak* es portador de los alelos tempranos y a los que hemos denominado *FAQ2-Shak-A* y *FAQ2-Shak-B*. El locus *FAQ2-Shak-A* se localiza entre las posiciones 1,96 y 2,83 Mb, mientras que el locus *FAQ2-Shak-B* está situado entre las posiciones 3,62 y 5,50 Mb (**Figura 36**). El fenotipo similar temprano de las líneas

portadoras de alelos Shak en cada una de estas regiones y el de las líneas que llevan alelos en ambas regiones, sugiere que estos dos loci interactúan genéticamente.

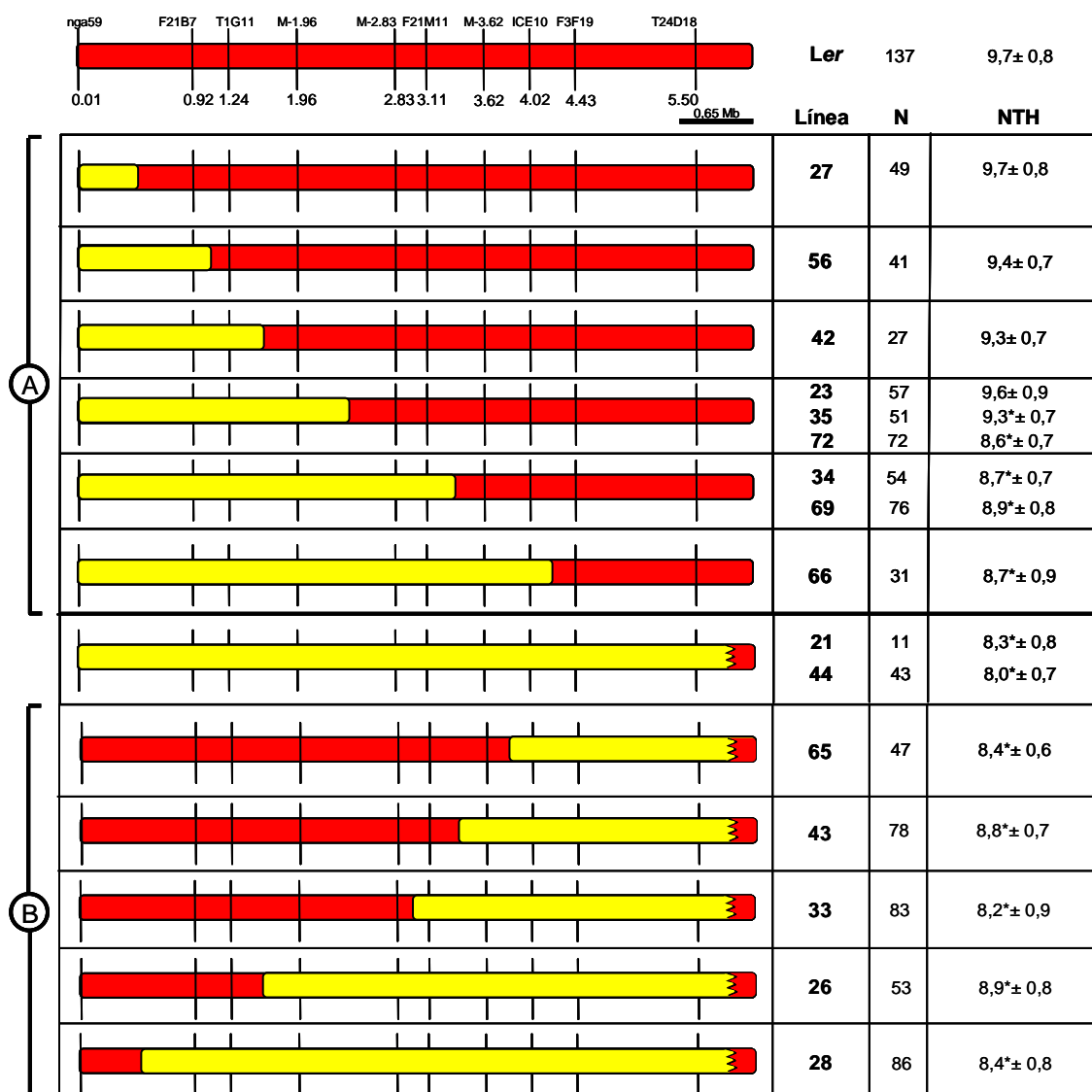


Figura 35. Análisis de las líneas de mini-introgresión de la región FAQ2-Shak.

A. Líneas distales; B. Líneas proximales. En la parte izquierda de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas de introgresión; las barras rojas representan la región FAQ2 de origen Ler y las barras amarillas representan las introgresiones de origen Shak. Las líneas verticales representan la posición de los marcadores moleculares analizados. En la parte derecha de la figura se muestran los valores de NTH de cada una de las líneas. **Línea**: número de la línea; **N**: número de individuos analizados, **NTH**: media ± DE del NTH, *: diferencias estadísticamente significativas con respecto a Ler ($P < 0,01$).

3.3.2.4 Análisis comparativo de la posición de los loci FAQ2 y sus genes responsables

La disección genética de las regiones FAQ2 de distinto origen muestra que existen al menos dos regiones responsables de la floración temprana en cada una de las regiones FAQ2-C24, FAQ2-Ri-0 y FAQ2-Shak. Sin embargo el análisis de las escaleras de líneas de mini-introgresión de FAQ2-C24 y FAQ2-Ri-0 muestra aditividad de los efectos de estas dos regiones mientras que las escaleras de FAQ2-Shak sugieren epistasia entre ambas. Como se muestra en la **Figura 36** las regiones distales en las que se han acotado los alelos FAQ2-C24-A y FAQ2-Ri-0-A respectivamente, solapan en un intervalo de 0,09 Mb (entre 1,15 y 1,24 Mb) por lo que en ambos casos podría tratarse del mismo locus. Por el contrario, la región distal FAQ2-Shak-A sólo solapa parcialmente con la región FAQ2-C24-B. Las tres regiones proximales (FAQ2-C24-B, FAQ2-Ri-0-B FAQ2-Shak-B) implicadas en el fenotipo temprano de floración

solaparon en un intervalo común de 0,30 Mb de longitud (entre 3,62 y 3,92 Mb) por lo que también podría tratarse del mismo locus. Por lo tanto, la comparación de las posiciones en las que se localizan los loci responsables del efecto *FAQ2* indica que existen al menos tres loci ligados en la región superior del cromosoma 1 que afectan a la floración.

Con el propósito de identificar genes implicados en el tiempo de floración dentro de la región *FAQ2* original de 7 Mb se analizó la secuencia genómica disponible en esa región (<http://www.arabidopsis.org>; Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Así se identificaron 5 genes para los que se ha descrito previamente efecto en el inicio de la floración y que podrían corresponder a los distintos loci *FAQ2* (**Figura 36**). El gen *LHY* que codifica para un factor de transcripción de tipo MYB implicado en el reloj circadiano, solapa únicamente con la región *FAQ2-Ri-0-A*. El gen *CRY2* localizado en la posición 1,18 Mb y solapa con *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-Ri-0-A* parece que no. La región *FAQ2-C24-B* solapa con los genes *PIF3* y *PHYA*, localizados en posiciones 3,07 y 3,09 Mb respectivamente. *GAI* localizado en la posición 5,14 Mb, únicamente solapa con la región *FAQ2-Shak-B* (**Figura 36**). Estos resultados sugieren que distintos alelos naturales de estos genes pueden contribuir al fenotipo temprano de *FAQ2* de estas accesiones. Además, el hecho que las regiones *FAQ2-Shak-A* y *FAQ2-Ri-0-B* no solapen con ninguno de los genes anteriores sugiere que al menos se han identificado dos loci nuevos responsables de la variación natural para la floración en arabidopsis.

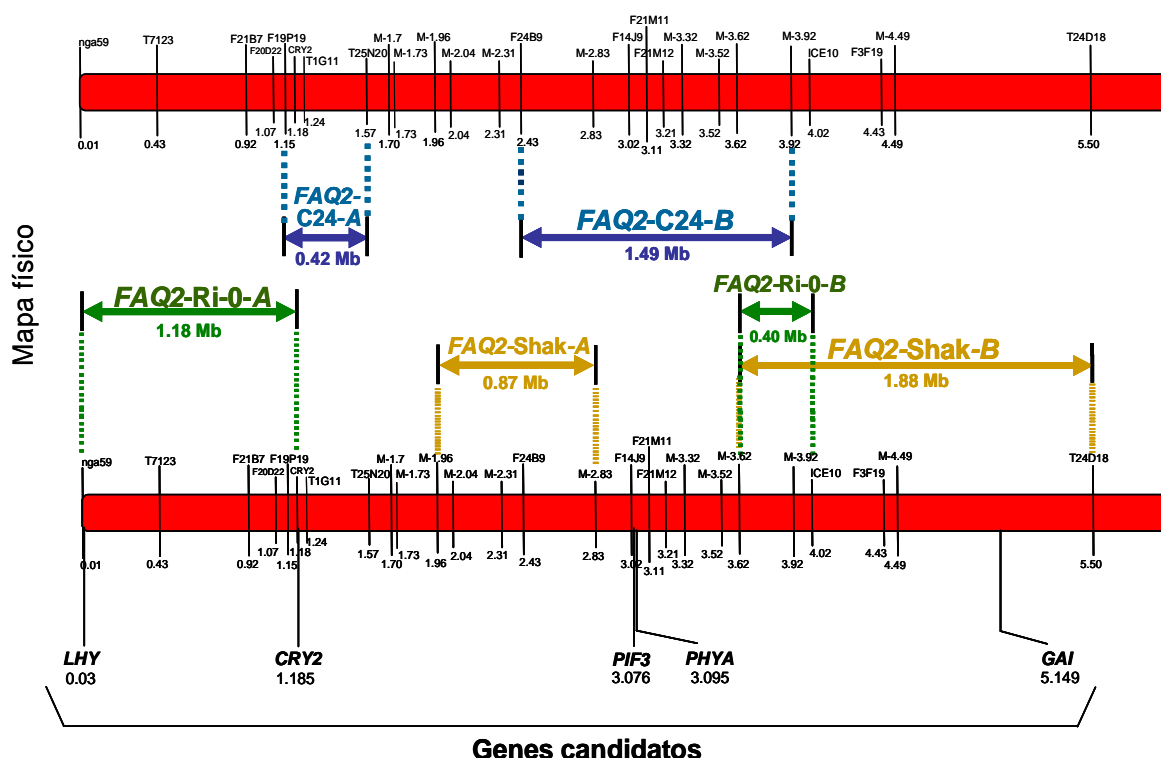


Figura 36. Mapeo fino de los alelos *FAQ2*.

En la parte superior se muestra el mapa físico de las regiones en las que se acotaron los alelos *FAQ2*. Las flechas de color azul muestran las regiones dónde se localizan los loci *FAQ2-C24*, las flechas de color verde las regiones dónde se localizan los loci *FAQ2-Ri-0* y las amarillas las regiones dónde mapean los loci *FAQ2-Shak*. En la parte inferior de la figura se especifican los genes y sus posiciones para los que se ha descrito algún efecto en el tiempo de floración.

3.4 Caracterización genética de los loci *FAQ2-C24*.

3.4.1 Análisis del efecto de los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*

Con el propósito de caracterizar los dos loci que se identificaron en el mapeo fino de *FAQ2-C24* se analizaron líneas de mini-introgresión con segmentos C24 no solapantes que cubren solamente una de las dos regiones. Para la región *FAQ2-C24-A* se seleccionó la línea C211

portadora de una región de origen C24 de alrededor de 1,5 Mb de longitud comprendida entre el telómero del brazo superior del cromosoma 1 y el marcador T25N20 en posición 1,57 Mb (ver **Figura 33A**). Para la región *FAQ2-C24-B* se seleccionó la línea C81 que portaba una introgresión de unas 3,5 Mb delimitada por los marcadores F24B9 y T24D18 en posiciones 2,43 y 5,50 respectivamente (ver **Figura 33B**). Además se analizó la línea C27 cuya introgresión de unas 3,8 Mb de longitud delimitada entre el telómero del brazo superior del cromosoma 1 y el marcador M-3,92 en la posición 3,92 cubría los dos loci (ver **Figura 33A**). Estas líneas junto con *Ler* se cultivaron en DL y DC y se analizó su fenotipo de floración (**Figuras 37 y 38**).

Como se muestra en la **Figura 37**, tanto para NTH como para TF en DL las tres líneas de mini-introgresión seleccionadas fueron más tempranas que el parental *Ler*, si bien la línea C27, portadora de ambos loci, fue la más temprana ($P < 0,01$). Los valores de NTH de las dos líneas *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* fueron intermedios y muy similares.

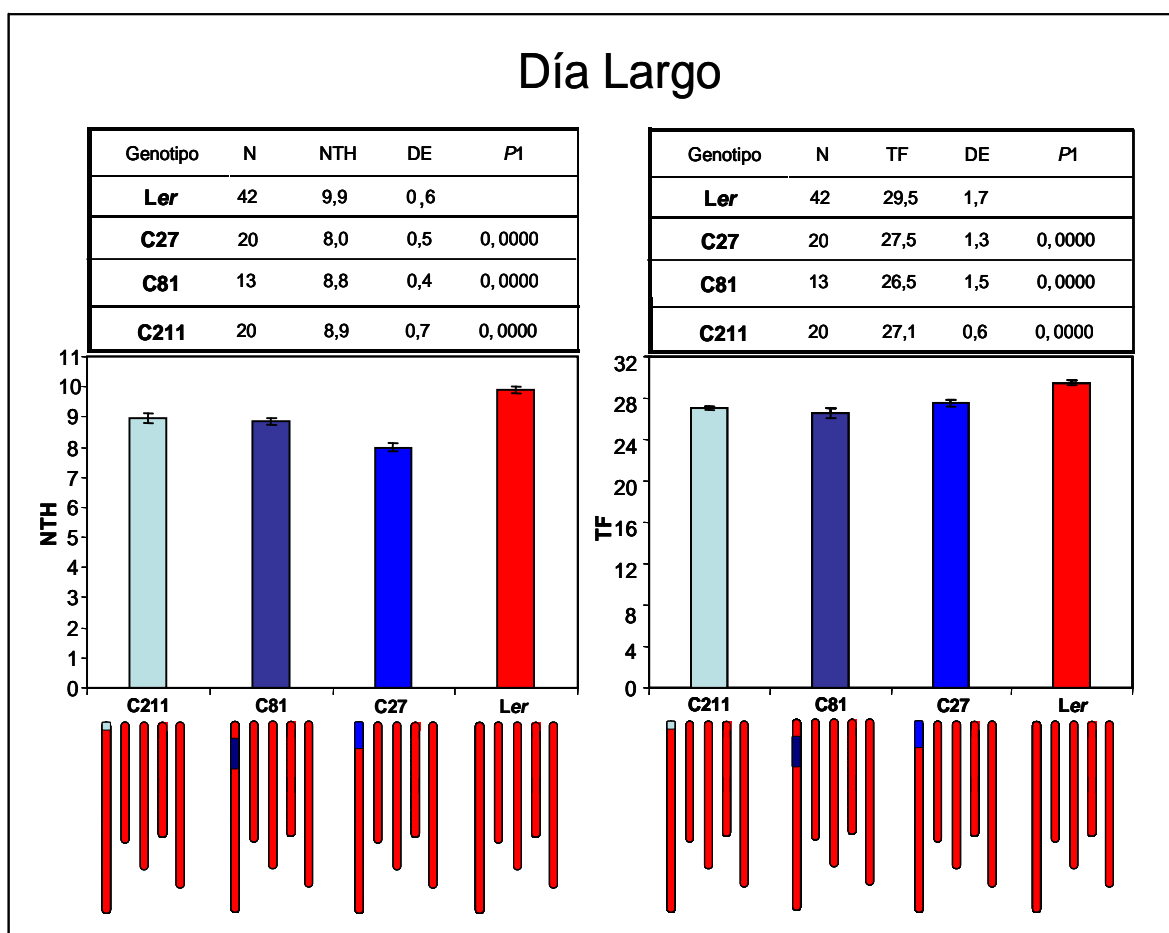


Figura 37. Efecto de los dos loci *FAQ2-C24* en el tiempo de floración en condiciones de día largo.

En las tablas superiores se indica: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas frente a *Ler*; En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y del tiempo de floración. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

En DC, las tres líneas de mini-introgresión fueron más tempranas que el parental *Ler* tanto en NTH como en TF (**Figura 38**). La línea C211 fue la más temprana floreciendo prácticamente al mismo tiempo que la línea C27, mientras que la línea C81 no mostró diferencias significativas de TF con respecto a *Ler* ($P > 0,01$).

Estos resultados muestran que los alelos C24 de los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*, presentes en las líneas C211 y C81 provocan floración temprana frente a los alelos del parental *Ler*. Ambos loci presentan un efecto similar, pequeño y aditivo en condiciones de DL. Sin

embargo en DC el locus *FAQ2-C24-A* presenta un efecto ligeramente mayor que *FAQ2-C24-B* que sugiere que el alelo C24 de *FAQ2-C24-A* reduce la respuesta al fotoperiodo. Esta observación sugiere que el efecto de ambos loci depende del ambiente ya que si bien ambos loci muestran efecto aditivo en condiciones de DL, en DC interaccionan genéticamente.

3.4.2. Relaciones de dominancia de los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*

La relación de dominancia de cada locus *FAQ2-C24* se estableció mediante el análisis en DL del NTH de plantas F_1 derivadas del cruzamiento de las líneas C211, C81 y C27 con Ler (Figura 39). Las plantas heterocigóticas para el locus *FAQ2-C24-A* florecieron prácticamente con el mismo número de hojas que la línea C211 homocigota para este locus ($P>0,01$) y significativamente antes que el parental Ler ($P<0,01$). De la misma forma las plantas heterocigóticas para el locus *FAQ2-C24-B* florecieron también con un número de hojas similar al de la línea C81 (homocigota para este locus) y menor que el del parental Ler ($P<0,01$; Figura 39A). Estos resultados indican que los alelos C24 de ambos loci *FAQ2-C24* se comportan como dominantes frente a los alelos de Ler. Esta observación contrasta aparentemente con el comportamiento de las plantas F_1 (Ler X C27) heterocigotas para ambos loci (Figura 39B) que presentaron un fenotipo intermedio entre ambos parentales sugiriendo una semidominancia general de los alelos C24 en ambas regiones.

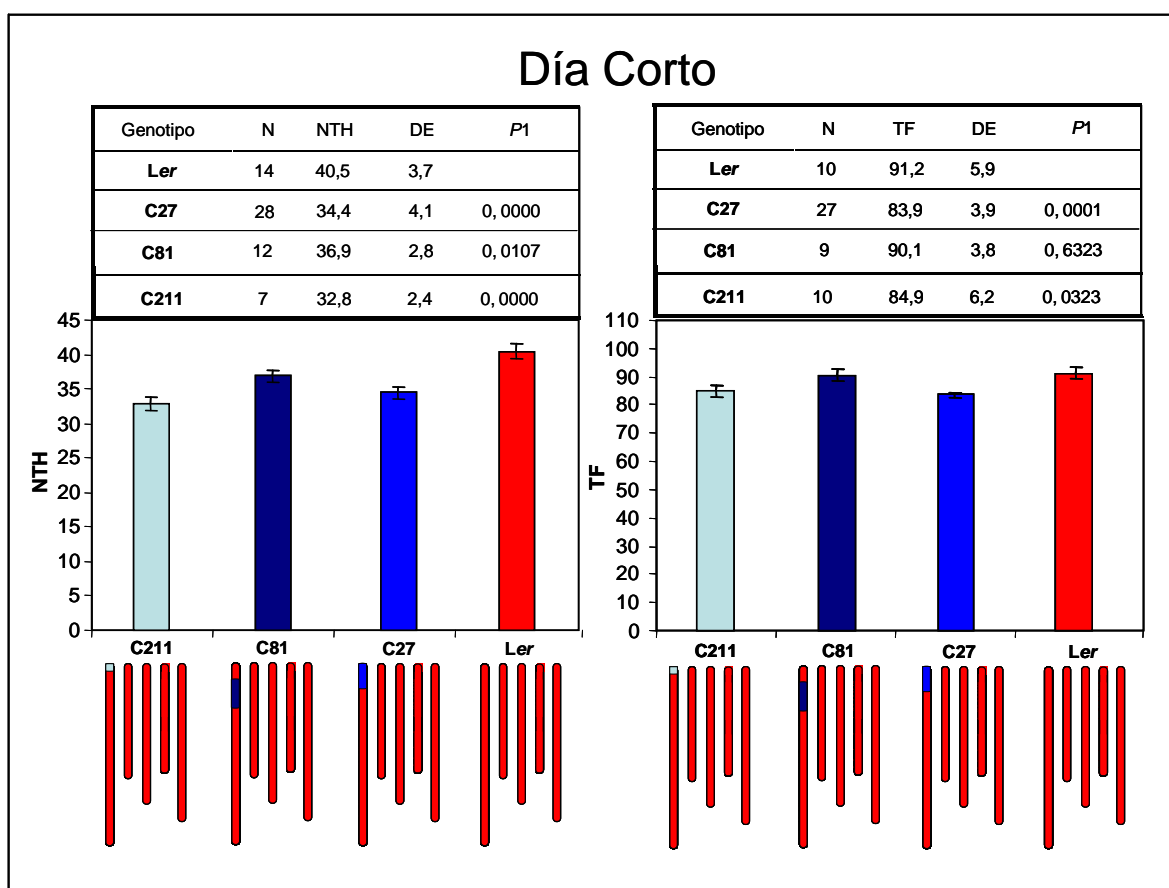


Figura 38. Efecto de los dos loci *FAQ2-C24* en el tiempo de floración en condiciones de día corto.

En las tablas superiores se indica: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **TF**: tiempo de floración; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada una de las líneas frente a Ler. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas y del tiempo de floración. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas.

El fenotipo temprano similar observado en plantas con una o dos dosis C24 de *FAQ2-C24-A* o *FAQ2-C24-B* pero más tardío que el de plantas con los 4 alelos C24, sugiere que la

aditividad de ambos loci depende parcialmente del número de dosis totales de alelos C24 en ambos loci, es decir, que ambos loci interaccionan genéticamente.

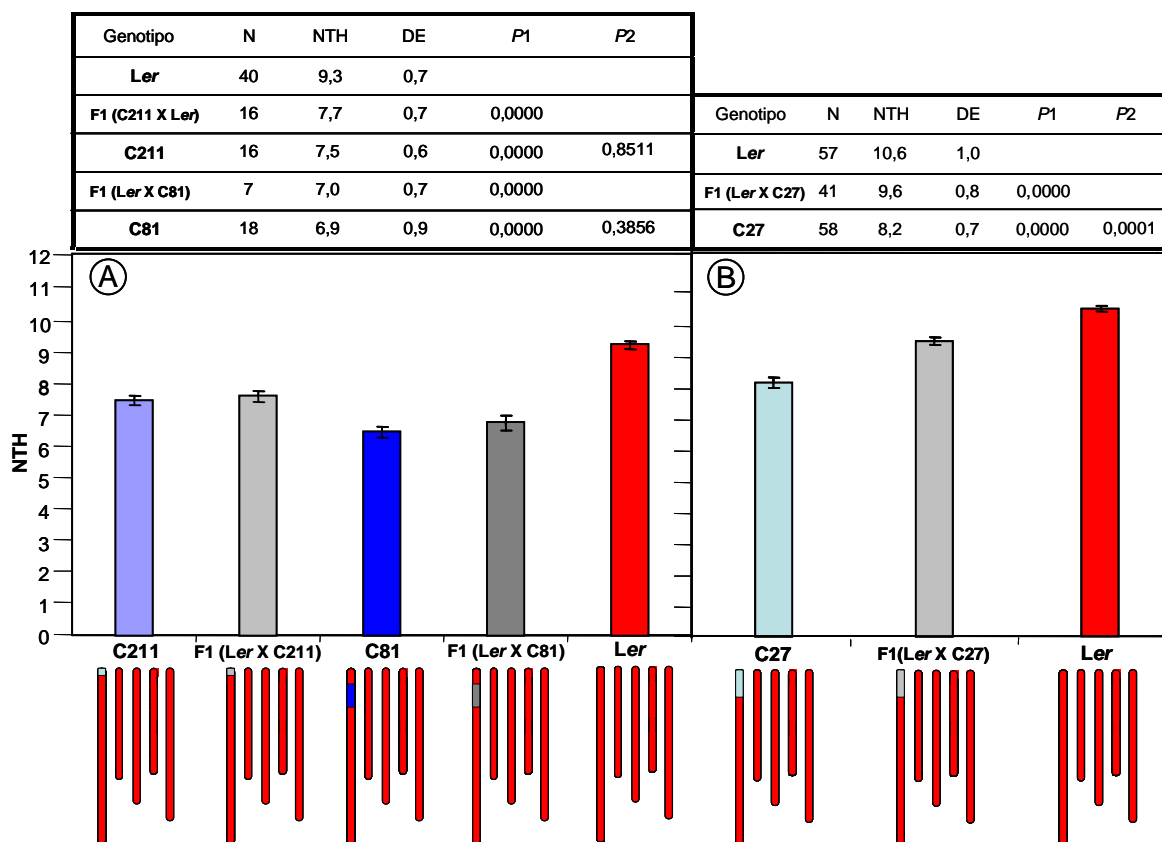


Figura 39. Relación de dominancia de los alelos *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*

A. Comportamiento de plantas heterocigotas para *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*. **B.** Comportamiento de las plantas heterocigotas para ambos loci *FAQ2-C24*. Los resultados se muestran separados ya que corresponden a experimentos diferentes. En las tablas superiores se indican: **N**: número de plantas analizadas; **NTH**: número total de hojas; **DE**: desviación estándar; **P1**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de las medias de cada uno de los genotipos analizados frente a Ler; **P2**: valores de probabilidad obtenidos en el contraste de medias de las distintas líneas homocigotas *FAQ2-C24* frente a sus correspondientes líneas F₁. En los histogramas, las barras representan la media \pm EE del número total de hojas. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas. El experimento se realizó en condiciones de DL.

3.4.3 Reconstrucción del fenotipo temprano *FAQ2-C24* a partir de líneas *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*

Con el propósito de demostrar conclusivamente el efecto temprano y aditivo en la floración de los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*, se reconstruyeron líneas portadoras de alelos C24 en ambos loci a partir de líneas C24 de cada locus. Para ello se cruzaron en ambos sentidos las líneas C211 y C81 descritas previamente (ver apartado 3.4.1) que incluían a *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* respectivamente. Por autofecundación de las plantas F₁ de los dos cruzamientos se obtuvieron un total de 327 plantas F₂ y se seleccionaron seis plantas recombinantes (105, 136, 245, 257, 268 y 303) entre los marcadores T1G11 y M-2,83 (en posiciones 1,24 y 2,83 Mb respectivamente) que eran homocigotas C24 para una de las introgresiones y heterocigotas para la otra. Para estimar la distancia genética mínima entre los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* se calculó la frecuencia de recombinación entre los marcadores T1G11 y M-2,83. De esta forma se estimó que estos loci están a una distancia genética de al menos 9 cM. Mediante el análisis de 16-20 plantas F₃ de cada recombinante F₂ con los marcadores moleculares de la región *FAQ2-C24* (Tabla 8), se seleccionaron de una a tres plantas homocigóticas C24 para ambas introgresiones (Figura 40).

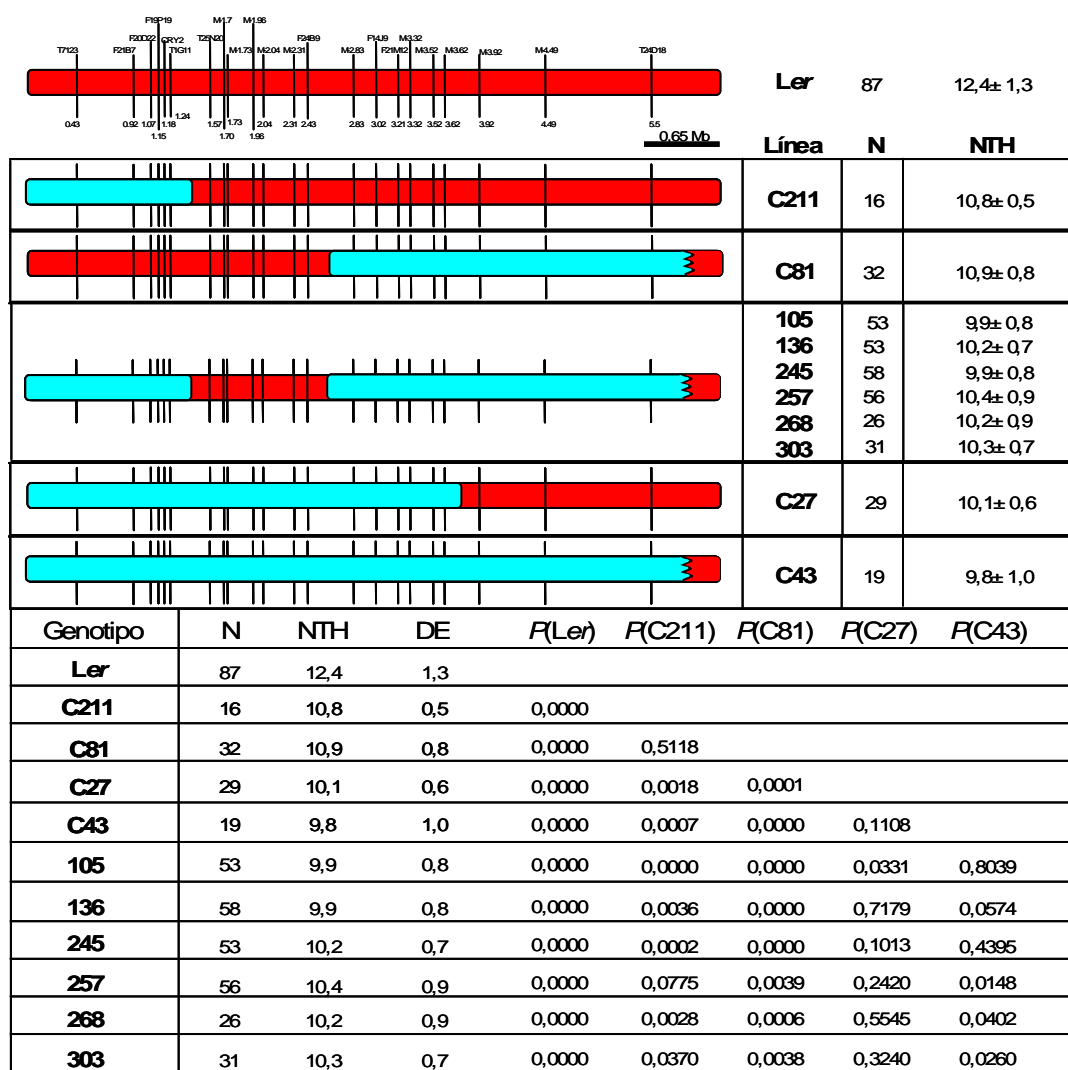


Figura 40. Reconstrucción del fenotipo temprano a partir de líneas FAQ2-C24-A y FAQ2-C24-B.

En la parte superior izquierda de la figura se muestran los genotipos gráficos de las líneas obtenidas en el análisis de reconstrucción junto a las líneas parentales C211, C81 y las líneas C27 y C43 que portan introgresiones de mayor tamaño que cubren los dos loci. Las barras rojas representan la región FAQ2 de origen Ler y las barras azules representan las introgresiones de origen C24. Las líneas verticales representan la posición de los marcadores moleculares analizados. En la parte derecha de la figura se muestran los valores de NTH de cada una de las líneas en condiciones de DL. **Línea:** número de la línea F_3/F_4 ; **N:** número de individuos analizados de cada línea, **NTH:** media \pm DE del NTH de cada línea analizada. En la tabla inferior los valores de probabilidad P corresponden a los contrastes de los valores fenotípicos medios de las distintas líneas frente a los genotipos indicados entre paréntesis.

El fenotipo de floración de estas líneas junto con el de las líneas parentales C211 y C81 se analizó en el invernadero en DL. Además se incluyeron las líneas C27 y C43 portadoras de alelos C24 en ambos loci FAQ2-C24 en homocigosis (**Figura 40**). Las seis líneas reconstruidas, las dos líneas parentales y las dos líneas con introgresiones mayores (C27 y C43) fueron más tempranas que Ler. De forma general el NTH de las líneas obtenidas fue menor que el de las dos líneas parentales (C211 y C81, $P < 0,01$) y similar al de las líneas C27 y C43 ($P > 0,01$). Sólo el NTH de dos líneas (257 y 303) no difirió significativamente con respecto a la línea parental C211, si bien fueron considerablemente más tempranas que ésta.

Estos resultados demuestran que la región FAQ2-C24 contiene al menos dos loci con efecto aditivo, cuyos alelos C24 producen floración temprana y se sitúan en las regiones no solapantes definidas por las introgresiones de las líneas C211 y C81. Además estos resultados sugieren que en la región genómica C24 existente entre ambos loci no se localizan otros loci que afecten al NTH y por tanto no existe complejidad adicional en esta región para el carácter analizado.

3.5 Análisis de los fotorreceptores *CRY2* y *PHYA* como candidatos a *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B*

3.5.1 Efecto de los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* sobre las respuestas a la luz

Puesto que *CRY2* y *PHYA* aparecen como genes candidatos a *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* respectivamente (**Figura 36**) nos propusimos determinar si estos loci afectaban la respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo mediada por estos fotorreceptores. Para ello se analizó la elongación del hipocótilo en un total de 7 líneas de mini-introgresión expuestas a tres longitudes de onda diferentes (luz roja, infrarroja y azul) y a distintas intensidades dentro de cada tipo de luz (ver **Materiales y Métodos**). Se seleccionaron las líneas C211 y C81 portadoras de introgresiones no solapantes correspondientes a los loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* y portadoras de los alelos C24 de *CRY2* y *PHYA* respectivamente.

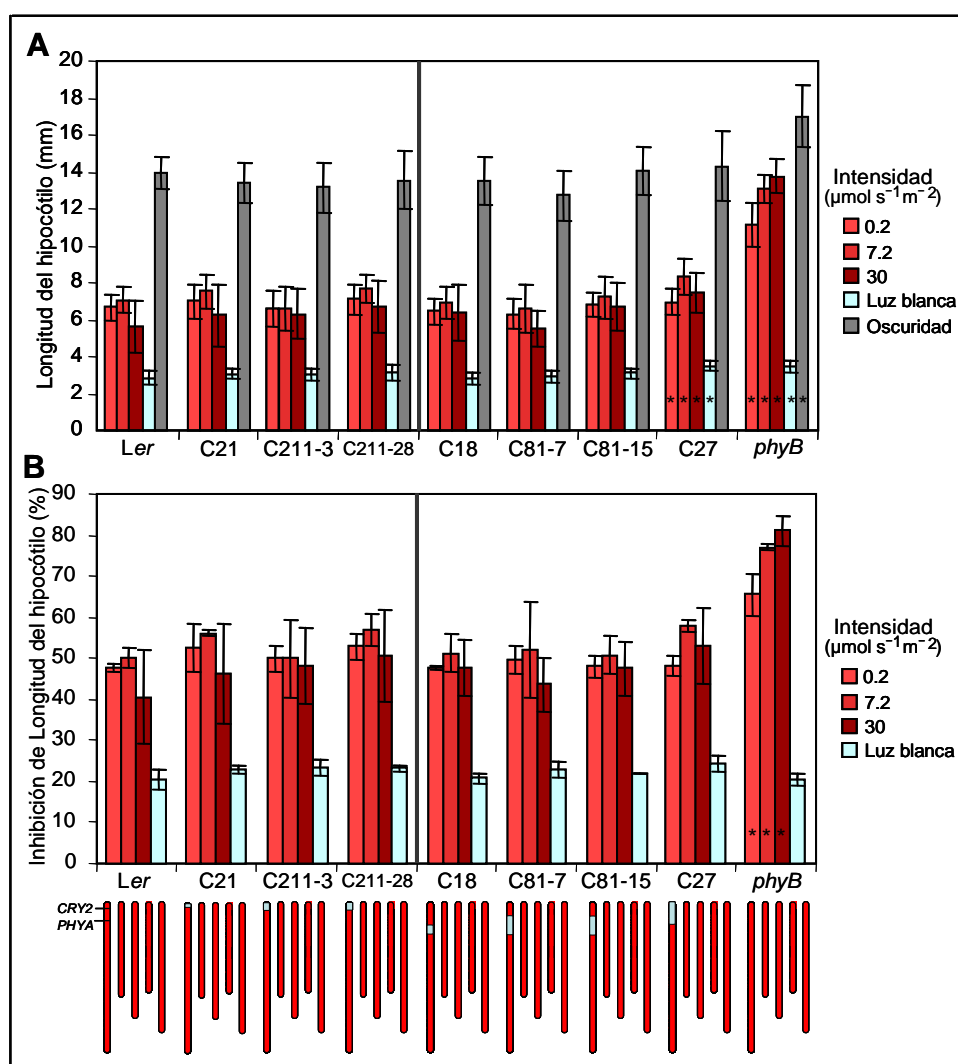


Figura 41. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de *FAQ2-C24* a la luz roja.

Las barras representan la media \pm DE de la longitud del hipocótilo de cada genotipo en tres replicas. **A.** Valores absolutos de longitud de hipocótilo obtenidos en las intensidades de luz analizadas (margen derecho). **B.** Valores de inhibición relativa de hipocótilo de cada genotipo con respecto a la elongación en condiciones de oscuridad. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas. El símbolo * en el interior de las barras indica que las diferencias con respecto a *Ler* son estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

Se incluyeron dos líneas hermanas C211 (C211-3 y C211-28) y dos C81 (C81-7 y C81-15). Además se analizaron las líneas C21 y C18, portadoras de introgresiones C24 distal y proximal respectivamente de menor tamaño que no incluyen *CRY2* y *PHYA* (**Figura 31**). Estas líneas

además son portadoras de alelos *Ler* en ambos loci *FAQ2-C24* ya que no difieren en su tiempo de floración con respecto a *Ler* (**Figura 31**). También se incluyó la línea C27 portadora de una introgresión C24 que cubre los dos loci *FAQ2-C24* y por tanto a *CRY2* y *PHYA*. Por último, en los tres experimentos se analizaron el parental *Ler* y los mutantes de los fotorreceptores *phyB-1*, *phyA-201* y *cry2-1* con efectos específicos para las distintas longitudes de onda analizadas.

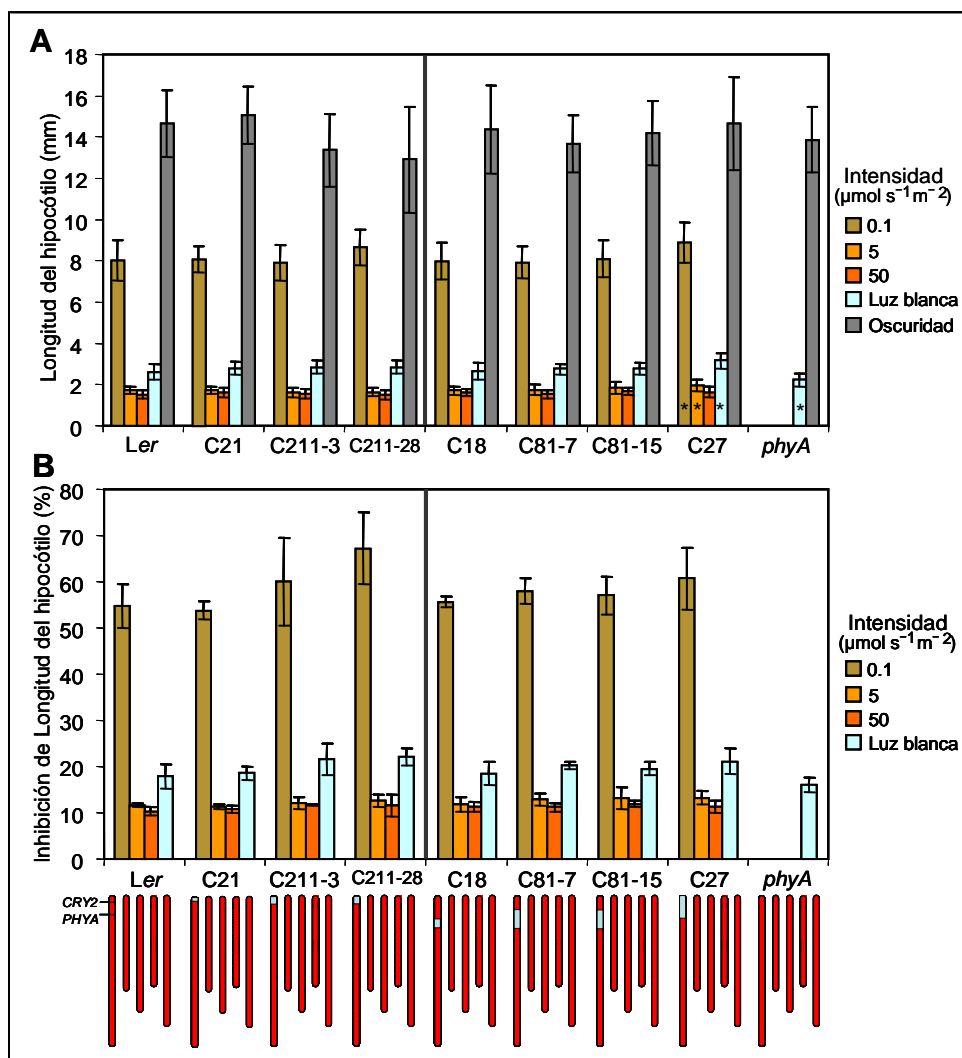


Figura 42. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de *FAQ2-C24* a la luz infrarroja.

Las barras representan la media \pm DE de la longitud del hipocótilo de cada genotipo en tres replicas. **A.** Valores absolutos de longitud de hipocótilo obtenidos en las intensidades de luz analizadas (margen derecho). **B.** Valores de inhibición relativa del hipocótilo de cada genotipo con respecto a la elongación en condiciones de oscuridad. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas. El símbolo * en el interior de las barras indica que las diferencias con respecto a *Ler* son estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

En cada una de las condiciones experimentales analizadas (luz roja, infrarroja y azul) se seleccionaron tres intensidades de luz diferentes alta, media y baja (**Figuras 41, 42 y 43**). Cada uno de los tres tipos de luz se analizó en un experimento independiente incluyendo los mismos genotipos en condiciones de luz blanca y oscuridad total. La media de la longitud del hipocótilo de cada genotipo se calculó a partir de 30 plántulas distribuidas en tres replicas de 10 individuos (**Figuras 41A, 42A y 43A**). La respuesta de inhibición de la elongación del hipocótilo por luz, de cada genotipo se calculó como la longitud relativa con respecto a la observada en oscuridad. Para determinar si existen diferencias en la respuesta a los distintos tipos de luces se comparó la longitud de los hipocótilos y la inhibición de su elongación de los diferentes genotipos con respecto a *Ler*.

Como se muestra en la **Figura 41** el mutante *phyB-1* presenta hipocótilo largo en condiciones de luz roja y responde poco a esta luz tal y como se ha descrito previamente (Koornneef, 1980). Únicamente la línea C27 presentó un hipocótilo significativamente más largo que Ler en las tres intensidades de luz roja, así como en la luz blanca ($P<0,01$). Sin embargo estas diferencias no fueron significativas cuando se analizó la inhibición relativa de la elongación por luz. El resto de los genotipos no difirieron en su elongación absoluta del hipocótilo ni en su inhibición relativa mediada por la luz roja.

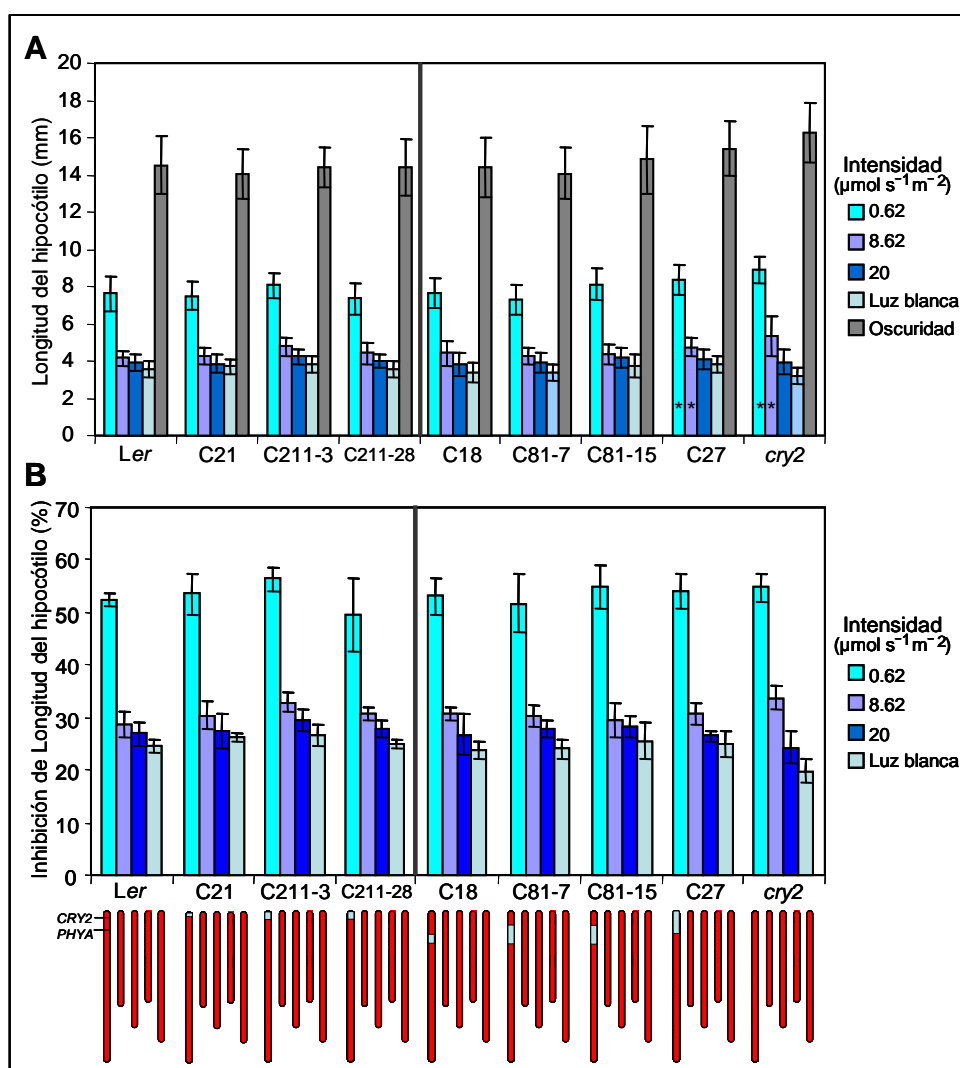


Figura 43. Respuesta de las líneas de mini-introgresión de FAQ2-C24 a la luz azul.

Las barras representan la media \pm DE de la longitud del hipocótilo de cada genotipo en tres replicas. **A.** Valores absolutos de longitud del hipocótilo obtenidos en las intensidades de luz analizadas (margen derecho). **B.** Valores de inhibición relativa del hipocótilo de cada genotipo con respecto a la elongación en condiciones de oscuridad. La parte inferior de la figura muestra los genotipos gráficos de las líneas analizadas. El símbolo * en el interior de las barras indica que las diferencias con respecto a Ler son estadísticamente significativas ($P<0,01$).

En los experimentos de luz infrarroja, desafortunadamente el mutante control *phyA-201* no germinó (**Figura 42**). Nuevamente sólo la línea de mini-introgresión C27 mostró un hipocótilo más largo que Ler en las tres intensidades de luz, aunque estas diferencias tampoco fueron significativas cuando se compararon los porcentajes de inhibición de alargamiento ($P>0,01$).

Por último, en luz azul (**Figura 43**) el mutante *cry2-1* presentó hipocótilo largo en condiciones de baja intensidad, de acuerdo con las observaciones previas. La línea C27 se comportó de forma similar al mutante *cry2-1*, donde las diferencias de inhibición de la

elongación del hipocótilo no fueron significativas. El resto de las líneas de mini-introgresión mostraron un comportamiento similar a *Ler*.

En conjunto, estos resultados indican que ninguno de los dos loci *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* afectan independientemente a la elongación del hipocótilo. Sin embargo, puesto que la presencia de alelos C24 en ambos loci reduce ligeramente la inhibición del alargamiento del hipocótilo mediado por los tres tipos de luz, ambos loci podrían interaccionar genéticamente para este carácter. No obstante, no se puede descartar que un tercer locus diferente situado entre *FAQ2-C24-A* y *FAQ2-C24-B* sea el causante de las diferencias observadas.

3.5.2 Análisis molecular del gen *CRY2* en las accesiones parentales

El locus *CRY2* se localiza dentro de la región dónde se ha mapeado *FAQ2-C24-A* por lo que se determinó a qué haplotipo pertenece cada una de las accesiones parentales utilizadas mediante el genotipado con los marcadores *CRY2-INDEL* y *CRY2-Bfa* (Tabla 9). Este análisis indica que las accesiones C24 y Shak presentan el haplotipo B, Ri-0 es portadora del haplotipo A^Q y *Ler* del haplotipo A^S.

La comparación de los haplotipos de *CRY2* de las accesiones analizadas con el fenotipo de floración de las líneas de introgresión utilizadas en los mapeos finos (Figura 44), muestra que Shak es portadora del haplotipo B temprano de *CRY2* pero no incluye este gen como candidato al locus *FAQ2-Shak-A*. Sin embargo, C24 y Ri-0 presentan haplotipos B y A^Q respectivamente, siendo *CRY2* candidato sólo para C24. Por lo tanto, estos resultados indican que otros polimorfismos en el gen *CRY2* deben afectar a su función y que como se ha mostrado anteriormente, otros genes de la misma región también son responsables del comportamiento diferencial de la floración con respecto a *Ler*.

LI <i>FAQ2</i>	Haplotipo <i>CRY2</i>	Fenotipo LIs <i>FAQ2</i> respecto a <i>Ler</i>	Líneas de mini-introgresión
Línea 300 <i>FAQ2-CRY2-Ri-0</i>	A ^Q	Temprano	
Línea 211 <i>FAQ2-CRY2-C24</i>	B	Temprano	
Línea 42 <i>FAQ2-CRY2-Shak</i>	B	Similar	

Figura 44. Análisis haplotípico de *CRY2* en las accesiones parentales.

Análisis del fenotipo de floración de líneas de mini-introgresión de origen Ri-0, C24 y Shak (LI *FAQ2*) cuyas introgresiones en las líneas de origen C24 y Shak solapan con el gen *CRY2*. A la derecha se muestra el genotipo gráfico de líneas de mini-introgresión de las distintas accesiones (Ri-0, C24 y Shak para las que se indican sus haplotipos de *CRY2*) analizadas en este trabajo y la posición de *CRY2* sobre las distintas introgresiones (en verde la de Ri-0, en azul la de C24 y en amarillo la de Shak) junto al fenotipo de floración observado en el mapeo fino en comparación a *Ler* (ver apartados 3.3.2.1, 3.3.2.2 y 3.3.2.3 de este capítulo). LI: línea isogénica de mini-introgresión

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones:

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La respuesta a la vernalización de LI-0 es más rápida que la de Ler y que la descrita para otras accesiones de laboratorio, indicando la existencia de variación cuantitativa en dicha respuesta.
2. Al menos cinco loci contribuyen a la diferente respuesta a la vernalización de LI-0 comparada con Ler. El alelo de LI-0 en tres de estos loci causa un retraso de la floración en condiciones sin vernalización que es reducido por el tratamiento de frío. El alelo de LI-0 en los otros dos loci acelera la floración principalmente después de la vernalización.
3. El análisis genético de LI-0 sugiere que esta accesión es portadora de nuevos alelos de genes ya conocidos como *FRI*, así como de nuevos loci que participan en la respuesta a la vernalización, como es el QTL de efecto menor del cromosoma 2.
4. La existencia de QTLs con distintos comportamientos genéticos, indica que existen varios mecanismos diferentes que participan en la variación natural para la respuesta a la vernalización.
5. Los análisis de regiones genómicas no sesgados, como el realizado a partir de la construcción de escaleras de líneas de mini-introgresión, permiten la disección precisa de la arquitectura genética de QTLs de efecto menor en el inicio de la floración.
6. *FAQ3* es un locus de efecto menor en el inicio de floración que se localiza en una región de 0,78 Mb del extremo del brazo superior del cromosoma 3.
7. *FAQ2* es un QTL complejo de efecto menor sobre el inicio de la floración localizado en el extremo del brazo corto del cromosoma 1 y se debe al efecto combinado de al menos dos loci estrechamente ligados.
8. El análisis genético de los alelos C24, Ri-0 y Shak *FAQ2* demuestra que el extremo superior del cromosoma 1 contiene al menos tres loci que contribuyen a la variación natural para la floración. La presencia de varios loci estrechamente ligados dificulta el mapeo comparativo de QTLs identificados en esta región en distintos cruzamientos.
9. Los fotorreceptores de luz azul *CRY2* y de luz roja *PHYA* probablemente contienen series de alelos naturales funcionales que podrían contribuir a la variación natural para el inicio de la floración causada por alguno de los loci *FAQ2*. Sin embargo otros genes desconocidos de la misma región genómica también contribuyen a dicha variación.
10. La arquitectura genética de la variación natural para el inicio de la floración en *Arabidopsis* es más compleja que la estimada con los mapeos primarios de QTLs en poblaciones segregantes de pequeño tamaño.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AGI2000. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P y Kay SA. (2001). Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**: 880-3
- Alonso-Blanco C, El-Assal SE, Coupland G y Koornneef M. (1998a). Analysis of natural allelic variation at flowering time loci in the Landsberg *erecta* and Cape Verde Islands ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 749-64
- Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Koornneef M, Lister C, Dean C, van den Bosch N, Pot J y Kuiper M. T. (1998b). Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J* **14**: 259-71
- Alonso-Blanco C, Blankestijn-de Vries H, Hanhart CJ y Koornneef M. (1999). Natural allelic variation at seed size loci in relation to other life history traits of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4710-7
- Alonso-Blanco C y Koornneef M. (2000). Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci* **5**: 22-9
- Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H y Koornneef M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**: 711-29
- Alonso-Blanco C, Méndez-Vigo B y Koornneef M. (2005a). From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* **49**: 717-32
- Alonso-Blanco C, Gomez-Mena C, Llorente F, Koornneef M, Salinas J y Martinez-Zapater JM. (2005b). Genetic and molecular analyses of natural variation indicate *CBF2* as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 1304-12
- Alonso-Blanco C, Koornneef M y van Ooijen JW. (2006). QTL analysis. *Methods Mol Biol* **323**: 79-99
- Amasino RM. (2005). Vernalization and flowering time. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 154-8
- Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Traw B, Zheng H, Bergelson J, Dean C, Marjoram P y Nordborg M. (2005). Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet* **1**: e60
- Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM y Sharrock RA. (1997). A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* **9**: 1317-26
- Ausin I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-Garcia L y Martinez-Zapater JM. (2004). Regulation of flowering time by *FVE*, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* **36**: 162-6
- Ausin I, Alonso-Blanco C y Martinez-Zapater JM. (2005). Environmental regulation of flowering. *Int J Dev Biol* **49**: 689-705
- Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. (2006a). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet* **2**: e106
- Balasubramanian S, Sureshkumar S, Agrawal M, Michael TP, Wessinger C, Maloof JN, Clark R, Warthmann N, Chory J y Weigel D. (2006b). The *PHYTOCHROME C* photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **38**: 711-5
- Barton NH y Keightley PD. (2002). Understanding quantitative genetic variation. *Nat Rev Genet* **3**: 11-21
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA y Dean C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* **427**: 164-7

- Bell CJ y Ecker JR. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137-44.
- Bentsink L, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D, Tesnier K, Groot SP y Koornneef M. (2000). Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**: 1595-604
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ y Koornneef M. (2006). Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17042-7
- Bernatzky R y Tanksley SD. (1986). Toward a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random cDNA Sequences. *Genetics* **112**: 887-898
- Bernier G y Perilleux C. (2005). A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnol J* **3**: 3-16
- Blazquez MA, Ahn JH y Weigel D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **33**: 168-71
- Borevitz JO, Maloof JN, Lutes J, Dabi T, Redfern JL, Trainer GT, Werner JD, Asami T, Berry CC, Weigel D y Chory J. (2002). Quantitative trait loci controlling light and hormone response in two accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **160**: 683-96
- Borevitz JO y Nordborg M. (2003). The impact of genomics on the study of natural variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**: 718-25
- Bouchez D y Hofte H. (1998). Functional genomics in plants. *Plant Physiol* **118**: 725-32
- Brock MT, Tiffin P y Weinig C. (2007). Sequence diversity and haplotype associations with phenotypic responses to crowding: *GIGANTEA* affects fruit set in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Ecol* **16**: 3050-62
- Caicedo AL, Stinchcombe JR, Olsen KM, Schmitt J y Purugganan MD. (2004). Epistatic interaction between *Arabidopsis FRI* and *FLC* flowering time genes generates a latitudinal cline in a life history trait. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15670-5
- Calenge F, Saliba-Colombani V, Mahieu S, Loudet O, Daniel-Vedele F y Krapp A. (2006). Natural variation for carbohydrate content in *Arabidopsis*. Interaction with complex traits dissected by quantitative genetics. *Plant Physiol* **141**: 1630-43
- Camus-Kulandaivelu L, Veyrieras JB, Madur D, Combes V, Fourmann M, Barraud S, Dubreuil P, Gouesnard B, Manicacci D y Charcosset A. (2006). Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. *Genetics* **172**: 2449-63
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L y Nickerson DA. (2004). Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* **74**: 106-20
- Cerdan PD y Chory J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**: 881-5
- Chandler J, Wilson A y Dean C. (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J* **10**: 637-44
- Chardon F, Virlon B, Moreau L, Falque M, Joets J, Decousset L, Murigneux A y Charcosset A. (2004). Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* **168**: 2169-85
- Chen KY y Tanksley SD. (2004). High-resolution mapping and functional analysis of *se2.1*: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. *Genetics* **168**: 1563-73

- Chou ML, Haung MD y Yang CH. (2001). *EMF* genes interact with late-flowering genes in regulating floral initiation genes during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**: 499-507
- Christians J K y Senger LK. (2007). Fine mapping dissects pleiotropic growth quantitative trait locus into linked loci. *Mamm Genome* **18**: 240-5
- Churchill GA y Doerge, RW. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**: 963-71
- Clark RM, Schweikert G, Toomajian C, Ossowski S, Zeller G, Shinn P, Warthmann N, Hu, TT, Fu G, Hinds DA, Chen H, Frazer KA, Huson DH, Scholkopf B, Nordborg M, Ratsch G, Ecker JR y Weigel D. 2007. Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **317**: 338-42
- Clarke JH y Dean C. (1994). Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **242**: 81-9
- Clarke JH, Mithen R, Brown JK y Dean C. (1995). QTL analysis of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **248**: 278-86
- Clauss MJ, Cobban H y Mitchell-Olds T. (2002). Cross-species microsatellite markers for elucidating population genetic structure in *Arabidopsis* and *Arabis* (Brassicaceae). *Mol Ecol* **11**: 591-601
- Clerkx EJ, El-Lithy ME, Vierling E, Ruys GJ, Blankestijn-De Vries H, Groot SP, Vreugdenhil D y Koornneef M. (2004). Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions Landsberg *erecta* and Shakhara, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol* **135**: 432-43
- Cooley NM, Higgins JT, Holmes MG y Attridge TH. (2001). Ecotypic differences in responses of *Arabidopsis thaliana* L. to elevated polychromatic UV-A and UV-B+A radiation in the natural environment: a positive correlation between UV-B+A inhibition and growth rate. *J Photochem Photobiol B* **60**: 143-50
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F y Fan Q. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030-3
- Cremer F y Coupland G. (2003). Distinct photoperiodic responses are conferred by the same genetic pathway in *Arabidopsis* and in rice. *Trends Plant Sci* **8**: 405-7
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI y Soler M. (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* **134**: 943-51
- Darvasi A y Soler M. (1997). A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet* **27**: 125-32
- Dennis ES y Peacock WJ. (2007). Epigenetic regulation of flowering. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 520-7
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Ariat M y Marco Y. (1998). Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MPMI* **11**: 659-67
- Devlin PF y Kay SA. (2000). Flower arranging in *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1600-2
- Doerge RW. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* **3**: 43-52
- Doi K, Izawa T, Fuse T, Yamanouchi U, Kubo T, Shimatani Z, Yano M, Yoshimura A y Noh YS. (2004). *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT*-like gene expression independently of *Hd1*. *Genes Dev* **18**: 926-36
- Doyle MR, Bizzell CM, Keller MR, Michaels SD, Song J, Noh YS y Amasino RMA. (2005). *HUA2* is required for the expression of floral repressors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **41**: 376-85

- El-Din El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Raz V y Koornneef M. (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2*. *Nat Genet* **29**: 435-40
- El-Din El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters AJ, Wagemaker C, Weller JL y Koornneef M. (2003). The role of *cryptochrome 2* in flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**: 1504-16
- El-Lithy ME, Clerckx EJ, Ruys GJ, Koornneef M y Vreugdenhil D. (2004). Quantitative trait locus analysis of growth-related traits in a new *Arabidopsis* recombinant inbred population. *Plant Physiol* **135**: 444-58
- El-Lithy ME, Bentsink L, Hanhart CJ, Ruys GJ, Rovito D, Broekhof JL, van der Poel HJ, van Eijk MJ, Vreugdenhil D y Koornneef M. (2006). New *Arabidopsis* recombinant inbred line populations genotyped using SNPWave and their use for mapping flowering-time quantitative trait loci. *Genetics* **172**: 1867-76
- Fair K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M y MO Diaz. (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate *MLL* target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* **21**: 3589-97
- Falconer DS, Mackay TFC (1996). Introduction to quantitative genetics. New York. Longman
- Farber CR, y Medrano JB. (2007). Dissection of a genetically complex cluster of growth and obesity QTLs on mouse chromosome 2 using subcongenic intercrosses. *Mamm Genome* **18**: 635-45
- Farrall M. (2004). Quantitative genetic variation: a post-modern view. *Human Molecular Genetics* **13**: 1-7
- Faure S, Higgins J, Turner A y Laurie DA. (2007). The *FLOWERING LOCUS T*-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics* **176**: 599-609
- Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G y Putterill J. (1999). *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *Embo J* **18**: 4679-88
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB y Tanksley SD. (2000). *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-8
- Fridman E, Liu YS, Carmel-Goren L, Gur A, Shoshitaishvili M, Carmel-Goren, Pleban T, Eshed L y Zamir, D. (2002). Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. *Mol Genet Genomics* **266**: 821-6
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR y Zamir D. (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**: 1786-9
- Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM y Dubcovsky, J. (2005). Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics* **273**: 54-65
- Garrett MR, Zhang X, Dukhanina OI, Deng AY y Rapp JP. (2001). Two linked blood pressure quantitative trait loci on chromosome 10 defined by dahl rat congenic strains. *Hypertension* **38**: 779-85
- Garrett MR y Rapp JP. (2002a). Multiple blood pressure QTL on rat Chromosome 2 defined by congenic Dahl rats. *Mamm Genome* **13**: 41-4
- Garrett MR y Rapp JP. (2002b). Two closely linked interactive blood pressure QTL on rat chromosome 5 defined using congenic Dahl rats. *Physiol Genomics* **8**: 81-6
- Gazzani S, Gendall AR, Lister C y Dean C. (2003). Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol* **132**: 1107-14
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A y Dean C. (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* **107**: 525-35
- Goodman HM, Ecker JR y Dean C. (1995). The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10831-5

- Greb T, Mylne JS, Crevillen P, Geraldo N, An H, Gendall AR y Dean C. (2007). The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis* FLC. *Curr Biol* **17**: 73-8
- Guo H, Yang H, Mockler TC y Lin C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* **279**: 1360-3.
- Gyllenstrand N, Clapham D, Kallman T y Lagercrantz U. (2007). A Norway spruce *FLOWERING LOCUS T* homolog is implicated in control of growth rhythm in conifers. *Plant Physiol* **144**: 248-57
- Hannah MA, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer AG y Hincha DK. (2006). Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142**: 98-112
- Harada H y Leigh RA. (2006). Genetic mapping of natural variation in potassium concentrations in shoots of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **57**: 953-60
- Hayama R y Coupland G. (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 13-9
- He Y, Michaels SD y Amasino RM. (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* **302**: 1751-4
- He Y y Amasino RM. (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci* **10**: 30-5
- Helliwell CA, Wood CC, Robertson M, James Peacock W y Dennis ES. (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J* **46**: 183-92
- Henderson IR y Dean C. (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* **131**: 3829-38
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA y Cox DR. (2005). Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* **307**: 1072-9
- Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, Monforte AJ, Lee GP, Howell SH y Kochian LV. (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg *erecta* x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol* **132**: 936-48
- Hoffmann MH. (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae). *Journal of Biogeography* **29**: 125-34
- Holland JB. (2007). Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 156-61
- Ingvarsson PK, Garcia MV, Hall D, Luquez V y Jansson S. (2006). Clinal variation in *phyB2*, a candidate gene for day-length-induced growth cessation and bud set, across a latitudinal gradient in European aspen (*Populus tremula*). *Genetics* **172**: 1845-53
- Jander G, Norris SR, Rounsley SD, Bush DF, Levin IM y Last RL. (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* **129**: 440-50
- Jansen RC y Stam P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* **134**: 1447-1455.
- Jansen RC, van Ooijen JW, Stam P, Lister C y Dean C. (1995). Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. *Theor Appl Genet* **91**: 33-7
- Jarillo JA, Pineiro M, Cubas P y Martinez-Zapater JM. (2008). Chromatin remodeling in plant development. *Int J Dev Biol* (en prensa)

- Jimenez-Gomez JM, Alonso-Blanco C, Borja A, Anastasio G, Angosto T, Lozano R y Martinez-Zapater JM. (2007). Quantitative genetic analysis of flowering time in tomato. *Genome* **50**: 303-15
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R y Dean C. (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* **290**: 344-7
- Juenger T, Purugganan M y Mackay TF. (2000). Quantitative trait loci for floral morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **156**: 1379-92
- Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ y Weigel D. (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* **286**: 1962-5
- Kearsey MJ, Pooni HS. (1994). The genetical analysis of quantitative traits. London. Chapman y Hall
- Kearsey MJ y Farquhar AG. (1998). QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* **80**: 137-42
- Keurentjes JJ, Fu J, de Vos CH, Lommen A, Hall RD, Bino RJ, van der Plas LH, Jansen RC, Vreugdenhil D y Koornneef M. (2006). The genetics of plant metabolism. *Nat Genet* **38**: 842-9
- Keurentjes JJ, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Blankestijn-De Vries H, Effgen S, Vreugdenhil D y Koornneef M. (2007). Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics* **175**: 891-905
- Kim S, Plagnol V, Hu TT, Toomajian C, Clark RM, Ossowski S, Ecker JR, Weigel D y Nordborg M. (2007). Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **39**: 1151-5
- King JJ y Stimart DP. (1998). Genetic analysis of variation for auxin-induced adventitious root formation among eighteen ecotypes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *J Hered* **89**: 481-7
- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J y Mitchell-Olds T. (2001). Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol* **126**: 811-25
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M y Araki T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**: 1960-2
- Kobayashi Y y Koyama H. (2002). QTL analysis of AI tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1526-33
- Kobayashi Y y Weigel D. (2007). Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev* **21**: 2371-84
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T y Yano M. (2002). *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**: 1096-105
- Kole C, Quijada P, Michaels S, Amasino R y Osborn TC. (2001). Evidence for homology of flowering time genes *VFR2* from *Brassica rapa* and *FLC* from *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **102**: 425-30
- Konieczny A y Ausubel M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* **4**: 403-10.
- Koornneef M y van der Veen JH. (1980). Induction and analysis of gibberelin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor Appl. Genet* **58**: 257-263
- Koornneef M, Hanhart CJ y van der Veen JH. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **229**: 57-66
- Koornneef M., Blankestijn de Vries, Hanhart CJ, Soppe W y Peeters AJ. (1994). The phenotype of some late-flowering mutants is enhanced by a locus on chromosome 5 that is not effective in the Landsberg *erecta* wild-type. *Plant J*. **6**:911-919

- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-de Vries H, Hanhart CJ y Peeters AJ. (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 885-92
- Koornneef M, Fransz P y de Jong H. (2003). Cytogenetic tools for *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res* **11**: 183-94
- Koornneef M, Alonso-Blanco C y Vreugdenhil D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 141-72
- Kosambi DD. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics* **12**: 172-175
- Kotake T, Takada S, Nakahigashi K, Ohto M y Goto K. (2003). *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER 2* gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol* **44**: 555-64
- Koumproglou R, Wilkes TM, Townson P, Wang XY, Beynon J, Pooni HS, Newbury HJ y Kearsey MJ. (2002). STAIRS: a new genetic resource for functional genomic studies of *Arabidopsis*. *Plant J* **31**: 355-64
- Kowalski SP, Lan TH, Feldmann KA y Paterson AH. (1994). QTL mapping of naturally-occurring variation in flowering time of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **245**: 548-55
- Kroymann J, Donnerhacke S, Schnabelrauch D y Mitchell-Olds T. (2003). Evolutionary dynamics of an *Arabidopsis* insect resistance quantitative trait locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14587-92
- Kroymann J y Mitchell-Olds T. (2005). Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature* **435**: 95-8
- Kuittinen H, Sillanpää MJ y Savolainen O. (1997). Genetic basis of adaptation: flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **95**: 573-83
- Kusnierczyk A, Winge P, Midelfart H, Armbruster WS, Rossiter JT y Bones AM. (2007). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *Myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *J Exp Bot* **58**: 2537-52
- Lander ES y Botstein D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199
- Le Corre V, Roux F y Reboud X. (2002). DNA polymorphism at the *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time. *Mol Biol Evol* **19**: 1261-71
- Le Corre V. (2005). Variation at two flowering time genes within and among populations of *Arabidopsis thaliana*: comparison with markers and traits. *Mol Ecol* **14**: 4181-92
- Ledger S, Strayer C, Ashton F, Kay SA y Putterill J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS-LIKE* genes. *Plant J* **26**: 15-22
- Lee I, Bleecker A y Amasino RM. (1993). Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **237**: 171-6
- Lee I, Aukerman MJ, Gore SL, Lohman KN, Michaels SD, Weaver LM, John MC, Feldmann KA y Amasino RM. (1994). Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 75-83
- Lee SJ, Liu J, Westcott AM, Vieth JA, DeRaedt SJ, Yang S, Joe B y Cicila GT. (2006). Substitution mapping in dahl rats identifies two distinct blood pressure quantitative trait loci within 1.12- and 1.25-mb intervals on chromosome 3. *Genetics* **174**: 2203-13
- Legare ME, Bartlett FS y Frankel WN. (2000). A major effect QTL determined by multiple genes in epileptic EL mice. *Genome Res* **10**: 42-8

Lehmann EL. (1975). Nonparametrics. New York.

Lempe J, Balasubramanian S, Sureshkumar S, Singh A, Schmid M y Weigel D. (2005). Diversity of flowering responses in wild *Arabidopsis thaliana* strains. *PLoS Genet* **1**: 109-18

Levy YY y Dean C. (1998). The transition to flowering. *Plant Cell* **10**: 1973-90

Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR y Dean C. (2002). Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science* **297**: 243-6

Li Y, Roycewicz P, Smith E y Borevitz JO. (2006). Genetics of local adaptation in the laboratory: flowering time quantitative trait loci under geographic and seasonal conditions in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **1**: e105

Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP y Eshed Y. (2006). The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6398-403

Lim MH, Kim J, Kim YS, Chung KS, Seo YH, Lee I, Hong CB, Kim HJ y Park CM. (2004). A new *Arabidopsis* gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell* **16**: 731-40

Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town, C. D. Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM y Venter JC. (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**: 761-8

Lin MK, Belanger H, Lee YJ, Varkonyi-Gasic E, Taoka K, Miura E, Xoconostle-Cazares B, Gendler K, Jorgensen RA, Phinney B, Lough TJ y Lucas WJ. (2007). *FLOWERING LOCUS T* protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* **19**: 1488-506

Lister C y Dean C. (1993). Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **4**: 745-50

Liu J, Van Eck J, Cong B y Tanksley SD. (2002). A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13302-6

Liu J, He Y, Amasino RM y Chen X. (2004). siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **18**: 2873-8

Llorente F, Alonso-Blanco C, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L y Molina A. (2005). *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* **43**: 165-80

Longman-Jacobsen N, Williamson JF, Dawkins RL y Gaudieri S. (2003). In polymorphic genomic regions indels cluster with nucleotide polymorphism: Quantum Genomics. *Gene* **312**: 257-61.

Loudet O, Chaillou S, Camilleri C, Bouchez D y Daniel-Vedele F. (2002). Bay-0 x Shahdara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in *Arabidopsis*. *Theor Appl Genet* **104**: 1173-84

Loudet O, Gaudon V, Trubuil A y Daniel-Vedele F. (2005). Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *Theor Appl Genet* **110**: 742-53

Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S y Daniel-Vedele F. (2007). Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by *APR2*. *Nat Genet* **39**: 896-900

- Lukowitz W, Gillmor CS y Scheible WR. (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**: 795-805
- Lynch My Walsh B. (1998). Genetic and analysis of quantitative traits. Sunderland. Sinauer Associates
- Mackay TF. (2004). The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 253-7
- Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Westphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C y Dean C. 1997. *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**: 737-45
- Magliano TM, Botto JF, Godoy AV, Symonds VV, Lloyd AM y Casal JJ. (2005). New *Arabidopsis* recombinant inbred lines (Landsberg *erecta* x Nossen) reveal natural variation in phytochrome-mediated responses. *Plant Physiol* **138**: 1126-35
- Maloof JN, Borevitz JO, Dabi T, Lutes J, Nehring RB, Redfern JL, Trainer GT, Wilson JM, Asami T, Berry CC, Weigel D y Chory J. (2001). Natural variation in light sensitivity of *Arabidopsis*. *Nat Genet* **29**: 441-6
- Maloof JN. (2006). Small but not forgotten. *Heredity* **96**: 1-2
- Martinez-Zapater JM, Coupland G, Dean C y Koornneef M. (1994). The transition to flowering in *Arabidopsis*. En *Arabidopsis*, ed. Meyerowitz EM y Somerville CR. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, págs 403-433
- Mathews S, Burleigh JG y Donoghue MJ. (2003). Adaptive evolution in the photosensory domain of phytochrome A in early angiosperms. *Mol Biol Evol* **20**: 1087-97
- Mauricio R, Stahl EA, Korves T, Tian D, Kreitman M y Bergelson J. (2003). Natural selection for polymorphism in the disease resistance gene *Rps2* of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **163**: 735-46
- McKay JK, Richards JH y Mitchell-Olds T. (2003). Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*: I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol Ecol* **12**: 1137-51
- Michael TP, Salome PA, Yu HJ, Spencer TR, Sharp EL, McPeck MA, Alonso JM, Ecker JR y McClung CR. (2003). Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* **302**: 1049-53
- Michaels SD y Amasino RM. (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949-56
- Michaels SD y Amasino RM. (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**: 935-41
- Michaels SD, He Y, Scortecci KC y Amasino RM. (2003). Attenuation of *FLOWERING LOCUS C* activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10102-7
- Michaels SD, Bezerra IC y Amasino RM. (2004). *FRIGIDA*-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3281-5
- Millar AA y Kunst L. (1999). The natural genetic variation of the fatty-acyl composition of seed oils in different ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **52**: 1029-33
- Mitchell-Olds T y Pedersen D. (1998). The molecular basis of quantitative genetic variation in central and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Genetics* **149**: 739-47
- Mitchell-Olds T y Schmitt J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature* **441**: 947-52

- Mockler T, Yang H, Yu X, Parikh D, Cheng YC, Dolan S y Lin C. (2003). Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2140-5
- Monforte AJ y Tanksley SD. 2000. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 471-9
- Monna L, Lin X, Kojima S, Sasaki T y Yano M. (2002). Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice. *Theor Appl Genet* **104**: 772-8
- Moon J, Lee H, Kim M y Lee I. (2005). Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **46**: 292-9
- Mouchel CF, Briggs GC y Hardtke CS. (2004). Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies *BREVIS RADIX*, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* **18**: 700-14
- Mouille G, Witucka-Wall H, Bruyant MP, Loudet O, Pelletier S, Rihouey C, Lerouxel O, Lerouge P, Hofte H y Pauly M. (2006). Quantitative trait loci analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 1035-44
- Mouradov A, Cremer F y Coupland G. (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* **14** : 111-30
- Murfet IC. (1977). The physiological genetics of flowering. En *The Physiology of the Garden Pea*. ed. Sutcliffe JF y Pate JS. London. Academic Press. págs 385-430
- Nagatani A, Reed JW y Chory J. (1993). Isolation and Initial Characterization of *Arabidopsis* Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol* **102**: 269-77
- Nagy F y Schafer E. (2000). Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *EMBO J* **19**: 157-63
- Napp-Zinn K. (1985). *Arabidopsis thaliana*. En *Handbook of flowering*, Vol.1 ed. Halevy HA. CRC Press, Boca Raton. FL. págs 492-503
- Ni M, Tepperman JM y Quail PH. (1998). *PIF3*, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-67
- Nordborg M y Bergelson J. (1999). The effect of seed and rosette cold treatment on germination and flowering time in some *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. *Am J Bot* **86**: 470-75
- Nordborg M, Hu TT, Ishino Y, Jhaveri J, Toomajian C, Zheng H, Bakker E, Calabrese P, Gladstone J, Goyal R, Jakobsson M, Kim S, Morozov Y, Padhukasahasram B, Plagnol V, Rosenberg NA, Shah C, Wall JD, Wang J, Zhao K, Kalbfleisch T, Schulz V, Kreitman M y Bergelson J. (2005). The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol* **3**: e196
- Oda A, Fujiwara S, Kamada H, Coupland G y Mizoguchi T. (2004). Antisense suppression of the *Arabidopsis PIF3* gene does not affect circadian rhythms but causes early flowering and increases *FT* expression. *FEBS Lett* **557**: 259-64
- Olsen KM, Halldorsdottir SS, Stinchcombe JR, Weinig C, Schmitt J y Purugganan MD. (2004). Linkage disequilibrium mapping of *Arabidopsis CRY2* flowering time alleles. *Genetics* **167**: 1361-9
- O'Neill CM, Morgan C, Kirby J, Tschoep H, Deng PX, Brennan M, Rosas U, Fraser F, Hall C, Gill S y Bancroft I. (2008). Six new recombinant inbred populations for the study of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **116**: 623-34

- Onouchi H, Igeno MI, Perilleux C, Graves K y Coupland G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* **12**: 885-900
- Osterberg MK, Shavorskaya O, Lascoux M y Lagercrantz U. (2002). Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* *COL1* gene is associated with variation in flowering time. *Genetics* **161**: 299-306
- Pagan I, Alonso-Blanco C y Garcia-Arenal F. (2007). The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS ONE* **2**: e786
- Palijan A, Lambert R, Dutil J, Sivo Z y Deng AY. (2003). Comprehensive congenic coverage revealing multiple blood pressure quantitative trait loci on Dahl rat chromosome 10. *Hypertension* **42**: 515-22
- Paran I y Zamir D. (2003). Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends Genet* **19**: 303-6
- Pasyukova, EG, Vieira C y Mackay TF. (2000). Deficiency mapping of quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **156**: 1129-46
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE y Tanksley SD. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* **335**: 721-6
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP y Harberd NP. (1997). The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194-205
- Peng M, Cui Y, Bi YM y Rothstein SJ. (2006). AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in *Arabidopsis*. *Plant J* **46**: 282-96
- Perchevied L, Kroj T, Tronchet M, Loudet O y Roby D. (2006). Natural variation in partial resistance to *Pseudomonas syringae* is controlled by two major QTLs in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **1**: e123
- Perez-Perez JM, Serrano-Cartagena J y Micol JL. (2002). Genetic analysis of natural variations in the architecture of *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Genetics* **162**: 893-915
- Pfalz M, Vogel H, Mitchell-Olds T y Kroymann J. (2007). Mapping of QTL for resistance against the crucifer specialist herbivore *Pieris brassicae* in a new *Arabidopsis* inbred line population, Da(1)-12xEi-2. *PLoS ONE* **2**: e578
- Picó FX, Méndez-Vigo B, Martínez-Zapater JM y Alonso-Blanco C. (2008). Natural genetic variation of *Arabidopsis thaliana* is geographically structured in the Iberian Peninsula. *Genetics*. (en prensa)
- Pigliucci M y Schmitt J. (2004). Phenotypic plasticity in response to foliar an neutral sade in gibberellin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology Research* **6**: 243-59
- Pigliucci M, Murren CJ y Schlichting CD. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol* **209**: 2362-7
- Piñeiro M, Gomez-Mena C, Schaffer R, Martinez-Zapater JM y Coupland G. (2003). *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing *FT*. *Plant Cell* **15**: 1552-62
- Podolin PL, Denny P, Armitage N, Lord CJ, Hill NJ, Levy ER, Peterson LB, Todd JA, Wicker LS y Lyons PA. (1998). Localization of two insulin-dependent diabetes (*Idd*) genes to the *Idd10* region on mouse chromosome 3. *Mamm Genome* **9**: 283-6
- Poduska B, Humphrey T, Redweik A y Grbic V. (2003). The synergistic activation of *FLOWERING LOCUS C* by *FRIGIDA* and a new flowering gene *AERIAL ROSETTE 1* underlies a novel morphology in *Arabidopsis*. *Genetics* **163**: 1457-65

- Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R y Coupland G. (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-57
- Putterill J, Laurie R y Macknight R. (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**: 363-73
- Quesada V, Garcia-Martinez S, Piqueras P, Ponce MR y Micol JL. (2002). Genetic architecture of NaCl tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 951-63
- Quesada V, Macknight R, Dean C y Simpson GG. (2003). Autoregulation of *FCA* pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *Embo J* **22**: 3142-52
- Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL y Riechmann JL. (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiol* **126**: 122-32
- Ratcliffe OJ, Kumimoto RW, Wong BJ y Riechmann JL. (2003). Analysis of the *Arabidopsis* *MADS AFFECTING FLOWERING* gene family: *MAF2* prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* **15**: 1159-69
- Redei GP. (1962). Supervital Mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **47**: 443-60
- Redei GP. (1992). A heuristic glance at the past of *Arabidopsis* genetics. *Methods in Arabidopsis Research*. eds C. Konz, NH Chua, J Schell, World Scientific, Singapore pp 1-15
- Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M y Chory J. (1994). *Phytochrome A* and *Phytochrome B* Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol* **104**: 1139-49
- Robbelen, G. (1965). The LAIBACH standard collection of natural races. *Arabidopsis Information Service* **2**.
- Rostoks N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR, Roose ML, Svensson, JT, Stein N, Varshney RK, Marshall DF, Graner A, Close TJ y Waugh R. (2006). Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18656-61
- Roux F, Touzet P, Cuguen J y Le Corre V. (2006). How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* **11**: 375-81
- Saad Y, Garrett MR y Rapp JP. (2001). Multiple blood pressure QTL on rat chromosome 1 defined by Dahl rat congenic strains. *Physiol Genomics* **4**: 201-14
- Saad Y, Yerga-Woolwine S, Saikumar J, Farms P, Manickavasagam E, Toland EJ y Joe B. (2007). Congenic interval mapping of *RNO10* reveals a complex cluster of closely-linked genetic determinants of blood pressure. *Hypertension* **50**: 891-8
- Salvi S y Tuberosa R. (2005). To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci* **10**: 297-304
- Salvi S, Sponza G, Morgante M, Tomes D, Niu X, Fengler KA, Meeley R, Ananiev EV, Svitashv S, Bruggemann E, Li B, Hailey CF, Radovic S, Zaina G, Rafalski JA, Tingey SV, Miao GH, Phillips RL y Tuberosa R. (2007). Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11376-81
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF y Coupland, G. (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-6
- Sanda SL y Amasino RM. (1996). Interaction of *FLC* and late-flowering mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **251**: 69-74
- Sawers RJ., Sheehan MJ y Brutnell TP. (2005). Cereal phytochromes: targets of selection, targets for manipulation? *Trends Plant Sci* **10**: 138-43

- Scarcelli N, Cheverud JM, Schaal BA y Kover PX. (2007). Antagonistic pleiotropic effects reduce the potential adaptive value of the *FRIGIDA* locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16986-91
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA y Coupland G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**: 219-29
- Schmitz RJ, Hong L, Michaels S y Amasino RM. (2005). *FRIGIDA-ESSENTIAL 1* interacts genetically with *FRIGIDA* and *FRIGIDA-LIKE 1* to promote the winter-annual habit of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**: 5471-8
- Schmitz RJ y Amasino RM. (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* **1769**: 269-75
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW y Amasino RM. (2001). *FPA*, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell* **13**: 1427-36
- Schonrock N, Bouveret R, Leroy O, Borghi L, Kohler C, Gruissem W y Hennig L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator *AGL19* in the *FLC*-independent vernalization pathway. *Genes Dev* **20**: 1667-78
- Schranz ME, Quijada P, Sung SB, Lukens L, Amasino R y Osborn TC. (2002). Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics* **162**: 1457-68
- Scortecci KC, Michaels SD y Amasino RM. (2001). Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *Plant J* **26**: 229-36
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino RA y Coupland G. (2006). The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 898-912
- Sergeeva LI, Vonk J, Keurentjes JJ, van der Plas LH, Koornneef M y Vreugdenhil D. (2004). Histochemical analysis reveals organ-specific quantitative trait loci for enzyme activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 237-45
- Sgro CM y Hoffmann AA. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* **93**: 241-8
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ y Dennis ES. (1999). The *FLFMADS* box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* **11**: 445-58
- Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ y Dennis ES. (2000). The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3753-8
- Shindo C, Aranzana MJ, Lister C, Baxter C, Nicholls C, Nordborg M y Dean C. (2005). Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**: 1163-73
- Shindo C, Lister C, Crevillen P, Nordborg M y Dean C. (2006). Variation in the epigenetic silencing of *FLC* contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. *Genes Dev* **20**: 3079-83
- Shindo C, Bernasconi G y Hardtke CS. (2007). Natural genetic variation in *Arabidopsis*: tools, traits and prospects for evolutionary ecology. *Ann Bot (Lond)* **99**: 1043-54
- Simon M, Loudet O, Durand S, Berard A, Brunel D, Sennesal FX, Durand-Tardif M, Pelletier G y Camilleri C. (2008). Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics* **178**: 2253-64

- Simpson GG, Gendall AR y Dean C. (1999). When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 519-50
- Simpson GG, Dijkwel PP, Quesada V, Henderson I y Dean C. (2003). *FY* is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell* **113**: 777-87
- Sineshchekov VA y Weller JL. (2004). Two modes of the light-induced *phytochrome A* decline--with and without changes in the proportion of its isoforms (phyA' and phyA''): evidence from fluorescence investigations of mutant *phyA-3D* pea. *J Photochem Photobiol B* **75**: 127-35
- Stahl EA, Dwyer G, Mauricio R, Kreitman M y Bergelson J. (1999). Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature* **400**: 667-71
- Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JL, Oefner PJ, McCusker JH y Davis RW. (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* **416**: 326-30
- Stinchcombe JR, Dorn LA y Schmitt J. (2004a). Flowering time plasticity in *Arabidopsis thaliana*: a reanalysis of Westerman & Lawrence (1970). *J Evol Biol* **17**: 197-207
- Stinchcombe JR, Weinig C, Ungerer M, Olsen KM, Mays C, Halldorsdottir SS, Purugganan MD, Schmitt J. (2004b). A latitudinal cline in flowering time in *Arabidopsis thaliana* modulated by the flowering time gene *FRIGIDA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4712-7
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA y Kay SA. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**: 768-71
- Stylianou IM, Christians JK, Keightley PD, Bunger L, Clinton M, Bulfield G y Horvat S. (2004). Genetic complexity of an obesity QTL (*Fob3*) revealed by detailed genetic mapping. *Mamm Genome* **15**: 472-81
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F y Coupland G. (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116-20
- Sung S y Amasino RM. (2004a). Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 4-10
- Sung S y Amasino RM. (2004b). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein *VIN3*. *Nature* **427**: 159-64
- Sung S y Amasino RM. (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 491-508
- Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L, Nakahigashi K, Goto K, Jacobsen SE y Amasino RM. (2006a). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet* **38**: 706-10
- Sung S y Amasino RM. (2006b). Molecular genetic studies of the memory of winter. *J Exp Bot* **57**: 3369-77
- Swarup K, Alonso-Blanco C, Lynn JR, Michaels SD, Amasino RM, Koornneef M y Millar AJ. (1999). Natural allelic variation identifies new genes in the *Arabidopsis* circadian system. *Plant J* **20**: 67-77
- Szucs P, Skinner JS, Karsai I, Cuesta-Marcos A, Haggard KG, Corey AE, Chen TH y Hayes PM. (2007). Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol Genet Genomics* **277**: 249-61
- Takada S y Goto K. (2003). *Terminal flower2*, an *Arabidopsis* homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**: 2856-65

- Takahashi Y, Shomura A, Sasaki T y Yano M. (2001). *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the alpha subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7922-7
- Takeuchi Y, Lin SY, Sasaki T y Yano M. (2003). Fine linkage mapping enables dissection of closely linked quantitative trait loci for seed dormancy and heading in rice. *Theor Appl Genet* **107**: 1174-80
- Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S y Shimamoto K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* **316**: 1033-6
- Tanksley SD. (1993). Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* **27**: 205-33
- Thomson MJ, Edwards JD, Septiningsih EM, Harrington SE y McCouch SR. (2006). Substitution mapping of *dth1.1*, a flowering-time quantitative trait locus (QTL) associated with transgressive variation in rice, reveals multiple sub-QTL. *Genetics* **172**: 2501-14
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D y Buckler ES. (2001). *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat Genet* **28**: 286-9
- Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J y Kreitman M. (2002). Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11525-30
- Tonsor S, Alonso-Blanco C y Koornneef M. (2005). Gene function beyond the single trait: natural variation, gene effects, and evolutionary ecology in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* **28**: 2-20
- Toomajian C, Hu TT, Aranzana MJ, Lister C, Tang C, Zheng H, Zhao K, Calabrese P, Dean C y Nordborg M. (2006). A nonparametric test reveals selection for rapid flowering in the *Arabidopsis* genome. *PLoS Biol* **4**: e137
- Torjek O, Witucka-Wall H, Meyer RC, von Korff M, Kusterer B, Rautengarten C y Altmann T. (2006). Segregation distortion in *Arabidopsis* C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. *Theor Appl Genet* **113**: 1551-61
- Torjek O, R. Meyer RC, Zehnsdorf M, Teltow M, Strompen G, Witucka-Wall H, Blacha A y Altmann T. (2008). Construction and analysis of 2 reciprocal *Arabidopsis* introgression line populations. *J Hered* **99**: 396-406.
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP y Laurie DA. (2005). The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* **310**: 1031-4
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A y Coupland G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-6
- Van Leeuwen H, Kliebenstein DJ, West MA, Kim K, van Poecke R, Katagiri F, Michelmore RW, Doerge RW y St Clair DA. (2007). Natural variation among *Arabidopsis thaliana* accessions for transcriptome response to exogenous salicylic acid. *Plant Cell* **19**: 2099-110
- Van Ooijen JW. (1992). Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor Appl Genet* **84**: 803-811
- Van Ooijen JW y Maliepaard C. (1996). MapQTL version 3.0[®]: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. *Plant Genome IV Abstracts*
- Van Ooijen JW y Voorrips RE. (2001). JoinMap[®] 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands
- Van Ooijen JW, Boer MP, Jansen RC y Maliepaard C. (2002). MapQTL 4.0[®], Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

- Wang ZY y Tobin EM. (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**: 1207-17
- Wang X, Le Roy I, Nicodeme E, Li R, Wagner R, Petros C, Churchill GA, Harris S, Darvasi A, Kirilovsky J, Roubertoux PL y Paigen B. (2003). Using advanced intercross lines for high-resolution mapping of HDL cholesterol quantitative trait loci. *Genome Res* **13**: 1654-64
- Wang Q, Sajja U, Rosloski S, Humphrey T, Kim MC, Bomblied K, Weigel D y Grbic V. (2007). *HUA2* caused natural variation in shoot morphology of *A. thaliana*. *Curr Biol* **17**: 1513-9
- Weigel D y Nordborg M. (2005). Natural variation in *Arabidopsis*. How do we find the causal genes? *Plant Physiol* **138**: 567-8
- Weinig C, Dorn LA, Kane NC, German ZM, Halldorsdottir SS, Ungerer MC, Toyonaga Y, Mackay TF, Purugganan MD y Schmitt J. (2003). Heterogeneous selection at specific loci in natural environments in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **165**: 321-9
- Weinig C y Schmitt J. (2004). Environmental Effects on the Expression of Quantitative Trait Loci and Implications for Phenotypic Evolution. *BioScience* **54**: 627-35
- Werner JD, Borevitz JO, Warthmann N, Trainer GT, Ecker JR, Chory J y Weigel D. (2005a). Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an *FLM* deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2460-5
- Werner JD, Borevitz JO, Uhlenhaut NH, Ecker JR, Chory J y Weigel D. (2005b). *FRIGIDA*-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics* **170**: 1197-207
- Wilson RN, Heckman JW y Somerville CR. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. *Plant Physiol* **100**: 403-08
- Wilson IW, Schiff CL, Hughes DE y Somerville SC. (2001). Quantitative trait loci analysis of powdery mildew disease resistance in the *Arabidopsis thaliana* accession Kashmir-1. *Genetics* **158**: 1301-9
- Wolyn DJ, Borevitz JO, Loudet O, Schwartz C, Maloof J, Ecker JR, Berry CC y Chory J. (2004). Light-response quantitative trait loci identified with composite interval and eXtreme array mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **167**: 907-17
- Wu R y Lin M. (2006). Functional mapping - how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. *Nat Rev Genet* **7**: 229-37
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N y McCough SR. (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet* **253**: 535-545
- Xu S. (2003). Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics* **165**: 2259-68
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T y Dubcovsky J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6263-8
- Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J y Dubcovsky J. (2004b). Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet* **109**: 1677-86
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V y Dubcovsky J. (2004a). The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* **303**: 1640-4
- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S y Dubcovsky J. (2006). The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19581-6

- Yano M y Sasaki T. (1997). Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol Biol* **35**: 145-53
- Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y y Sasaki T. (2000). *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**: 2473-84
- Yanovsky MJ y Kay SA. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 308-12
- Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS y Ahn JH. (2005). *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 770-8
- Zhang S, Lou Y, Amstein TM, Anyango M, Mohibullah N, Osoti A, Stancliffe D, King R, Iraqi F y Gershenfeld HK. (2005). Fine mapping of a major locus on chromosome 10 for exploratory and fear-like behavior in mice. *Mamm Genome* **16**: 306-18.
- Zhang Z, Ober JA y Kliebenstein DJ. (2006). The gene controlling the quantitative trait locus *EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1* alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1524-36
- Zhao K, Aranzana MJ, Kim S, Lister C, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Zheng H, Dean C, Marjoram P y Nordborg M. (2007). An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet* **3**: e4